



**Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.**  
Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental

**“Alteraciones en respuestas inmunológicas y antioxidantes en camarón blanco *Litopenaeus vannamei* expuesto a Diazinón”**

Por:

Martha Daniela Dorantes Valdez

Tesis aprobada por:

**UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Mazatlán, Sinaloa.

Diciembre de 2010

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite citas breves sin permiso especial del autor, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente. Se podrá solicitar al Director del Centro o Jefe de Área correspondiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora CP 83000 México, para citas o consultas más completas con fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

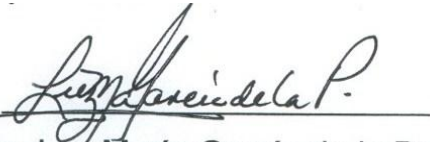
La publicación en comunidades científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del director.

---

Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General del CIAD, A. C.

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Martha Daniela Dorantes Valdez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.



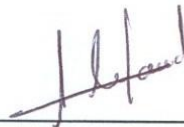
Dra. Luz María García de la Parra

Directora de Tesis



Dr. Miguel Betancourt Lozano

Asesor



Dra. Silvia Alejandra García Gasca

Asesor



Dr. Oscar Basilio Del Río Zaragoza

Asesor



M. en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez

Asesor

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por los apoyos económicos brindados durante mi maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por brindarme la facilidad de sus instalaciones como laboratorios, organismos de estudio, reactivos, etc.

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECyT) por los apoyos económicos para la finalización de esta tesis.

Al B.P. Luis Adrián Gámez Alejo, a la B. Carolina Bernal Cevallos, Ing. Francis Isela Marrujo López, M. en C. Selene María Abad Rosales, M.V.Z. Rodolfo Lozano Olvera, M en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez, M. en C. Gabriela Aguilar Zárate, M. en C. Leobardo Montoya Rodríguez, Dra. María Soledad Morales Covarrubias e I. Víctor Joaquín Álvarez, por su colaboración en alguna parte del proceso de esta tesis, ya sea en la toma de muestras, dominio de los organismos, o simplemente por transmitir sus conocimientos hacia mí, gracias.

A mis compañeros y amigos de maestría, I.B. Martha Olivia Palomec Antonio, I.B. Mauricio Eduardo Escalante Rojas, I.B. Ulises Alcaraz Saucedo, y B. Marco Antonio Beltrán Velarde, por ser algo más que simples compañeros y estar acompañándome en los buenos y malos ratos.

A mi familia por ser el principal motor y la razón de todo, especialmente mi mamá, mi abuela y mi hermana y a amigas de siempre Sherezada Elenes, Jacqueline Estrada y Diane Velarde por aguantar mi ausencia y aprovechar esos pequeños momentos para brindarme su apoyo y cariño incondicional, los quiero.

## CONTENIDO

	Página
<b>CONTENIDO</b> .....	4
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	8
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	12
<b>II. GENERALIDADES</b> .....	17
2.1 Litopenaeus Vannamei .....	17
2.2 Plaguicidas .....	18
2.2.1 Clasificación y propiedades de los plaguicidas .....	20
2.2.2 Plaguicidas Organofosforados (OPs) .....	21
2.2.2.1 <i>Modo de acción de plaguicidas organofosforados: Inhibición de acetilcolinesterasa</i> .....	23
2.2.3 Plaguicida Organofosforado Diazinón .....	26
2.3 Sistema Inmunológico de crustáceos .....	28
2.3.1 Hemocitos .....	30
2.3.2 Sistema profenoloxidasa .....	33
2.4 Estrés Oxidativo .....	34
2.4.1 Enzima antioxidante Superóxido Dismutasa (SOD) .....	37
2.4.2 Peroxidación lipídica .....	38
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	40
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	46
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	47
5.1 Objetivo General.....	47

5.2	Objetivos Particulares.....	47
<b>VI.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
6.1	Organismos de Estudio.....	48
6.2	Bioensayos Preliminares .....	49
6.2.1	Selección de Técnicas para Inocular el Tóxico .....	49
6.2.2	Estandarización de las Técnicas para Evaluar Biomarcadores.....	50
6.2.2.1	<i>Actividad de acetilcolinesterasa (AChE)</i> .....	51
6.2.2.2	<i>Recuento total de hemocitos</i> .....	52
6.2.2.3	<i>Recuento diferencial de hemocitos</i> .....	53
6.2.2.4	<i>Actividad de Fenoloxidasa total (FO total), Fenoloxidasa (FO) y profenoloxidasa (proFO).</i> .....	54
6.2.2.5	<i>Actividad de superóxido dismutasa (SOD)</i> .....	56
6.2.2.6	<i>Peroxidación de Lípidos (LPO)</i> .....	57
6.3	Bioensayos de letalidad.....	59
6.3.1	Pruebas de intervalo de toxicidad .....	59
6.4	Toxicidad subletal .....	64
6.5	Obtención de muestras.....	65
6.6	Procesamiento de muestras .....	67
6.7	Análisis Cromatográficos .....	69
6.8	Análisis estadístico .....	70
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>72</b>
7.1	Dosis Letal media (DL50) .....	72
7.2	Cromatografía de gases de las soluciones de prueba.....	72
7.3	Estadio de muda.....	73
7.4	Actividad de Acetilcolinesterasa .....	75

7.5	Recuento Total de Hemocitos (RTH) .....	79
7.6	Actividad de Fenoloxidasa Total, Fenoloxidasa (FO) y Profenoloxidasa (proFO) .....	89
7.7	Actividad de superóxido dismutasa (SOD) .....	93
7.8	Peroxidación de Lípidos (LPO) .....	95
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>101</b>
<b>IX.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>103</b>
<b>ANEXO I</b>	.....	<b>117</b>
<b>ANEXO II</b>	.....	<b>118</b>
<b>ANEXO III</b>	.....	<b>121</b>
<b>ANEXO IV</b>	.....	<b>125</b>
<b>ANEXO V</b>	.....	<b>127</b>
<b>ANEXO VI</b>	.....	<b>129</b>
<b>ANEXO VII</b>	.....	<b>131</b>
<b>ANEXO VIII</b>	.....	<b>133</b>
<b>ANEXO IX</b>	.....	<b>136</b>

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Diagrama mostrando los efectos de los plaguicidas y sus metabolitos en los organismos. ....	13
<b>Figura 2.</b> a) Estructura general de los plaguicidas organofosforados, b) Estructura de subclases de organofosforados.....	22
<b>Figura 3.</b> Principal mecanismo de acción que ejercen los plaguicidas organofosforados: inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). ....	26
<b>Figura 4.</b> Estructura del Diazinón. ....	27
<b>Figura 5.</b> Activación del sistema inmunológico ante la presencia de patógenos y activación del sistema profenoloxidasa. ....	30
<b>Figura 6.</b> Diagrama que representa el proceso de maduración de hemocitos. ....	32
<b>Figura 7.</b> Reducción tetravalente del oxígeno y las principales especies reactivas formadas. ....	34
<b>Figura 8.</b> Principales enzimas antioxidantes involucradas en el mantenimiento del balance redox. ....	36
<b>Figura 9.</b> Dismutación del radical hidroxilo en peróxido de hidrógeno y agua. ....	37
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de mortalidad de la tercera prueba de letalidad con Diazinón.....	64
<b>Figura 11.</b> Obtención de muestras de hemolinfa, músculo, pleópodo y conservación del resto del organismo para evaluar las diferentes pruebas. ....	66
<b>Figura 12.</b> Procedimiento para la obtención de muestras. ....	68
<b>Figura 13.</b> Dosis letal media (DL50) de Diazinón a 24, 48, 72 y 96 h en <i>L. vannamei</i> . ....	72
<b>Figura 14.</b> Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h).....	76



<b>Figura 15.</b> Actividad de acetilcolinesterasa en músculo de <i>L. vannamei</i> expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos de muestreo (6, 24 y 72 h). .....	78
<b>Figura 16.</b> Recuento total de hemocitos (RTH) de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h).....	80
<b>Figura 17.</b> Recuento diferencial de hemocitos de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h).....	83
<b>Figura 18.</b> Recuento diferencial de hemocitos de <i>L. vannamei</i> expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6 h.....	84
<b>Figura 19.</b> Recuento diferencial de hemocitos (RDH) de <i>L. vannamei</i> expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 24 h.....	85
<b>Figura 20.</b> Recuento diferencial de hemocitos de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 72 h.....	86
<b>Figura 21.</b> Hemocitos granulares, semigranulares y hialinos.....	88
<b>Figura 22.</b> Actividad de Fenoloxidasa total, Fenoloxidasa y profenoloxidasa de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6 h.....	90
<b>Figura 23.</b> Actividad de fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 24 h.....	91
<b>Figura 24.</b> Actividad de fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 72 h.....	92
<b>Figura 25.</b> Actividad de superóxido dismutasa en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h).....	94
<b>Figura 26.</b> Contenido de malondialdehido (MDA) como producto de la peroxidación de lípidos en hemolinfa de <i>L. vannamei</i> expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos de muestreo (6, 24 y 72 h). .....	97

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>L. vannamei</i> .....	17
<b>Tabla 2:</b> Clasificación de los plaguicidas según varios criterios .....	20
<b>Tabla 3.</b> Propiedades físico- químicas Diazinón.....	27
<b>Tabla 4.</b> Los diferentes tipos de hemocitos, sus características y función.....	31
<b>Tabla 5.</b> Valores de toxicidad aguda del Diazinón en diferentes especies. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Concentración nominal y real de la solución madre .....	73
<b>Tabla 7.</b> Dosis nominal y real de Diazinón .....	73
<b>Tabla 8.</b> Porcentajes de estadio de muda de <i>L. vannamei</i> a 6 h en cada tratamiento..	74
<b>Tabla 9.</b> Porcentajes de estadio de muda de <i>L. vannamei</i> a 24 h en cada tratamiento	74
<b>Tabla 10.</b> Porcentajes de estadio de muda de <i>L. vannamei</i> a 72 h en cada tratamiento .....	75

## RESUMEN

Los plaguicidas pueden ejercer un efecto inmunotóxico en el organismo, y ser un factor asociado con la prevalencia a enfermedades en crustáceos. En este trabajo se abordaron respuestas del sistema inmunológico como el recuento total y diferencial de hemocitos (RTH y RDH), sistema colinérgico como la actividad de acetilcolinesterasa (AChE), el sistema antioxidante mediante la actividad de superóxido dismutas (SOD) y un indicador de estrés oxidativo como la peroxidación de lípidos en camarón blanco *L vannamei* expuesto a tres diferentes dosis del plaguicida organofosforado Diazinón (5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón). A las 6 h se presentó disminución de actividad de AChE, RTH, y RDH de manera dependiente de la dosis, mientras que la SOD y FO no demuestran estar activadas a etapas iniciales post exposición, y la LPO presenta valores altos en la dosis baja y media. A las 24 h inicia una aparente fase de recuperación en la actividad de AChE, RTH, RDH, mientras que la actividad de SOD y FO comienza a activarse, y la LPO disminuye de manera dependiente de la dosis. Finalmente a las 72 h, se observan valores similares entre los tratamientos y el control en la actividad de AChE, RTH, RDH, SOD, y FO, mientras que en la LPO no se presentó ninguna tendencia. Por lo tanto se concluye que el plaguicida causó una rápida y máxima inducción en respuestas a las 6 h, algunas se mantuvieron hasta las 24 h , y finalmente a las 72h post exposición los organismos presentaron un periodo de compensación para contrarrestar los efectos y de esta manera finalmente pudieron recuperarse a la exposición del plaguicida.

## I. INTRODUCCION

En el estado de Sinaloa, debido al clima cálido y a la facilidad de irrigación de 11 ríos, la pesca, el cultivo de camarón (principalmente *Litopenaeus vannamei*), así como la agricultura intensiva, son las actividades económicas más productivas de la región, sobre todo en las áreas adyacentes a la costa. Por lo tanto, las lagunas costeras se integran de una mezcla de agua, de tierras de arrastre de la agricultura y de efluentes de granjas de camarón (Lyle-Fritch *et al.*, 2006).

Debido a la estrecha interacción que existe entre acuicultura, ambiente y agricultura, los organismos acuáticos, entre ellos los crustáceos, constantemente reciben la influencia de numerosos estresores, los cuales son factores determinantes para la susceptibilidad de los organismos a enfermedades (Le Moullac y Haffner, 2000). Entre estos estresores se pueden mencionar la variación de factores ambientales (como los cambios fisicoquímicos del agua, y los ritmos estacionales, etc.) y/o contaminantes de origen doméstico (detergentes, insecticidas, etc.), industrial (metales pesados, PCBs) o agrícola (plaguicidas, fertilizantes) que en grandes cantidades pueden afectar la salud de los organismos (Carbajal- Hernández, 2007).

En la agricultura, los tipos y cantidades de plaguicidas usados varían en relación a los cultivos (McKinlay *et al.*, 2008). Sin embargo, en algunos se aplican cantidades por arriba de los niveles recomendados con la finalidad de no perder las cosechas por alguna plaga. Lo anterior ocasiona que los plaguicidas una vez aplicados se dispersen en el ambiente vía atmósfera, suelos, sedimentos, y aguas costeras y subterráneas, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. De este modo los residuos de plaguicidas permanecen en el ambiente por un tiempo prolongado (Konstantinou *et al.*, 2006).

En general, se ha demostrado que los plaguicidas alteran el balance redox celular, ya que provocan efectos en algunas funciones neurológicas e inmunológicas mediante diferentes mecanismos, como: a) su conversión enzimática a productos secundarios y/o especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), b) por debilitamiento de defensas antioxidantes, y c) por deterioro de la función de enzimas antioxidantes (Fig. 1) (Banerjee, 1999; Franco *et al.*, 2009).



**Figura 1.** Diagrama mostrando los efectos de los plaguicidas y sus metabolitos en los organismos (Tomado de Banerjee, 1999).

Los plaguicidas organofosforados presentan menor lipofilia y persistencia en el ambiente en relación a los plaguicidas organoclorados utilizados anteriormente en la agricultura, por esta razón, los organofosforados se consideran la nueva generación de plaguicidas (Cerón *et al.* 1996). Sin embargo, éstos tienen mayor toxicidad, debido a que su principal mecanismo de acción es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), ocasionando a corto plazo importantes efectos adversos, debido a la hiperexcitación del sistema nervioso central (Eto, 1974; Girón-Pérez *et al.*, 2008).

Un plaguicida organofosforado de amplio uso agrícola, doméstico y veterinario es el Diazinón (O, O-dietil O-(6-metil-2-{1-metiletil}-4-pirimidinil fosforotioato, C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>PS). Dentro de la escala toxicológica, está clasificado como moderadamente tóxico (categoría III y IV) (CICOPLAFEST, 2004), debido a que se degrada rápidamente. Sin embargo, el oxipirimidin, un metabolito del Diazinón es móvil y persistente en el ambiente, quedando disponible para organismos no blanco (EPA, 2004).

En varios estudios de campo se ha documentado la presencia de estos compuestos en cuerpos de agua a concentraciones que pueden afectar la vida acuática. Los crustáceos, debido a la relación filogenética que tienen con los insectos, son más sensibles a los efectos tóxicos de muchos contaminantes en comparación con peces y moluscos (Couch, 1978). Con base a lo anterior, algunas especies de crustáceos, como *L. vannamei*, son considerados especies bioindicadoras. Esto se debe a que cumple con los criterios que definen a una especie bioindicadora como son: a) sus hábitos alimenticios y posición en la cadena trófica; b) su gran abundancia y amplia distribución geográfica a lo largo del litoral del Pacífico mexicano; c) sus patrones migratorios y susceptibilidad a condiciones ambientales adversas (Betancourt- Lozano y García de la Parra, en prensa).

Los crustáceos como el camarón dependen de un sistema inmunológico innato (respuestas celulares y humorales) para protegerse contra los diversos estresores bióticos o abióticos y de esta manera mantener su integridad corporal y homeostática (Ai *et al.*, 2009). Dicho sistema emplea una diversa serie de respuestas con el objetivo de neutralizar y eliminar agentes extraños presentes en el organismo, tales como: fagocitosis, formación de nódulos y cápsulas, producción de péptidos antimicrobiales, melanización mediante el sistema profenoloxidasa y producción de ROS (Holmblad y Soderhall, 1999).

Un importante mecanismo de defensa inmunológica en los crustáceos es la melanización, la cual está involucrada en el proceso de esclerotización de la cutícula y curación de heridas, así como también participa en la formación de nódulos, ó encapsulación (Sritunyalucksana y Soderhall, 2000). La melanina es el producto final del sistema profenoloxidasa, el cual es activado por componentes de la superficie de patógenos. Una vez activado el sistema, se inicia una cascada molecular durante la cual se pueden producir intermediarios tóxicos como quinonas y ROS (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2009).

Las especies reactivas de oxígeno producidas durante la activación del sistema profenoloxidasa, durante la fagocitosis o como parte normal del metabolismo, representan un importante mecanismo citotóxico contra patógenos (Muñoz *et al.*, 2000). Las concentraciones de ROS son reguladas por el sistema antioxidante, el cual tiene como función principal, mantener un balance entre la producción de ROS y la eliminación de éstos mediante los diferentes antioxidantes (Afonso *et al.*, 2007).

Un apropiado balance redox es crucial para la función normal de las células y tejidos. Sin embargo, cuando se presenta una excesiva producción de ROS, o el sistema antioxidante se debilita y pierde la capacidad de eliminar los ROS, ocurre una situación llamada: estrés oxidativo (Afonso *et al.*, 2007; Franco

*et al.*, 2009). El estrés oxidativo daña lípidos, comprometiendo la integridad de la célula, proteínas, ocasionando el malfuncionamiento de enzimas encargadas de realizar funciones celulares, ácidos nucleicos, lo cual origina mutaciones, rompimiento de cadenas de ADN dobles o sencillas, y eventualmente muerte celular.

El daño oxidativo se puede evaluar midiendo la integridad o alteración de cualquiera de las tres moléculas mencionadas anteriormente. Sin embargo uno de los métodos más utilizados en estudios de monitoreo es la peroxidación de lípidos mediante la formación de malondialdehído, el cual es un subproducto de la peroxidación de lípidos (Esterbauer *et al.*, 1991).

El sistema antioxidante y el sistema inmune son considerados componentes esenciales en el mantenimiento del organismo (Mathew *et al.*, 1997), sin embargo en camarones la información disponible sobre la integración de estos dos sistemas ante la presencia de un plaguicida es muy escasa comparado con lo que se conoce en peces y moluscos.

En el presente estudio se utilizó al camarón blanco *L. vannamei*, para evaluar el efecto inmunotóxico ocasionado por el plaguicida organofosforado Diazinón, mediante la actividad de la Fenoloxidasa (FO) y el recuento total (RTH) y diferencial de hemocitos (RDH); así como un componente del sistema antioxidante, como la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), y un indicador de daño oxidativo como lo es la peroxidación de lípidos (LPO).



## II. GENERALIDADES

### 2.1 *Litopenaeus Vannamei*

El camarón blanco, *L. vannamei*, es un crustáceo tropical, cuya posición taxonómica se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *L. vannamei*

<b>Phylum:</b>	Arthropoda
<b>Clase:</b>	Malacostraca
<b>Orden:</b>	Decapoda
<b>Suborden:</b>	Dendobranchiata
<b>Superfamilia:</b>	Penaeoidea
<b>Familia:</b>	Penaeidae
<b>Género:</b>	<i>Litopenaeus</i>
<b>Especie:</b>	<i>vannamei</i>

El camarón blanco del Pacífico, *L. vannamei*, es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora, México hasta Tumbes, Perú en Sudamérica, donde la temperatura del agua normalmente es superior a 20 °C todo el año (FAO, 2006-2010). Habita fondos fangosos de la costa desde los tres hasta los 72 m en el mar abierto. Los camarones adultos viven y se reproducen en mar abierto hasta 32 km de la costa, mientras que juveniles y postlarvas migran a estuarios y lagunas costeras debido a la mayor disponibilidad de recursos (Corona *et al.*, 2000). Sus hábitos alimenticios cambian de acuerdo con su etapa de desarrollo, alimentándose desde fitoplancton o zooplancton en etapas larvales hasta poliquetos, moluscos e incluso pequeños peces en su etapa adulta (Bailey-Brock y Moss, 1992).

Debido a que esta especie tolera un gran intervalo de salinidades (entre 1 a 50 ppm), y de que se obtienen buenos rendimientos de crecimiento, aún cuando está en cautiverio. Es por lo que esta es una especie importante para la acuicultura en varios países como Brasil, Ecuador, México, Estados Unidos, Tailandia y China (Jaime- Ceballos *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008).

La pesca del camarón en el Pacífico mexicano es soportada por tres especies: *L. vannamei* (camarón blanco), *L. stylirostris* (camarón azul), *Farfantepenaeus californiensis* (camarón café), y en menor extensión *Farfantepenaeus brevirostris* (camarón cristal) y *Trachypenaeus pacificus* (camarón zebra) (Paéz- Osuna *et al.*, 2003). No obstante en cuanto al cultivo de este crustáceo, la producción ha sido históricamente dominada por *L. vannamei*.

En el cultivo de camarón, la sustentabilidad depende en gran medida del estado de salud de los organismos, el cual está fuertemente influenciado por alteraciones de los factores ambientales, los factores genéticos y la presencia de los compuestos químicos utilizados en la agricultura o en las propias granjas. Estas condiciones favorecen la presencia de patógenos como virus, bacterias y hongos, los cuales en los últimos años han provocado mortalidades masivas en cultivos de camarón en varias partes del mundo (Lightner y Redman, 1998; Rodríguez y Le Moullac, 2000).

## 2.2 Plaguicidas

El término plaguicida se refiere a cualquier sustancia o mezcla de sustancias que es usada para controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria

y forestal. Sin embargo, en algunos casos, pueden tener un impacto letal o subletal en organismos no blanco (CICOPLAFEST, 2004).

Con el inicio de la llamada *Era de la Química Moderna*, durante la Segunda Guerra Mundial, se comenzaron a utilizar los plaguicidas organoclorados (OC's), como el DDT, para combatir el piojo del tifus y evitar la proliferación de epidemias y a su vez, se desarrollaron algunos compuestos organofosforados, como el tabún y el sarín, mejor conocidos como gases nerviosos, que eran utilizados como armas químicas (Ware y Whitacre, 2004).

Dos décadas posteriores, hubo un uso indiscriminado de compuestos OC's para combatir plagas principalmente en la agricultura, e incluso durante las campañas de salud donde se aplicaron para contrarrestar enfermedades como la malaria. Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, los compuestos OC's eran difícilmente biodegradables, por lo que resultó una seria amenaza para la mayoría de las especies (Calva y Torres, 1998).

Esto causó gran preocupación por lo que a finales de 1960, y principios de 1970, en países industrializados se empezaron a prohibir los plaguicidas organoclorados y fueron reemplazados por los plaguicidas organofosforados (OP's), debido a su rápida degradación y menor persistencia en el ambiente (Walker, 2001).

Actualmente, de los 150 millones de km<sup>2</sup> de la tierra, el 10 % está dedicado a la producción agrícola, donde la mayoría de la producción depende de la aplicación de plaguicidas para satisfacer las demandas del crecimiento de la población humana (Devine *et al.*, 2007). En lo que se refiere a México, la tierra disponible para la agricultura es de unos 23 millones de ha, cerca del 12 % de la superficie total del país. Según los datos disponibles, las regiones con mayor uso de plaguicidas son: Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de

México, Puebla y Oaxaca. En estas áreas se aplica el 80 % del total de plaguicidas usados en el país (González- Farías, 2003).

### 2.2.1 Clasificación y propiedades de los plaguicidas

Los plaguicidas, son sustancias que presentan diversas características y se han clasificado en grupos que básicamente dependen de su estructura. A su vez también pueden clasificarse según la plaga que combaten, su modo de acción, su toxicidad, o su persistencia. Sin embargo, la más utilizada está basada en su estructura química. De este modo se clasifican en: plaguicidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, ácidos carboxílicos, piretroides, amidas, anilinas, derivados alquil de urea, compuestos heterocíclicos con nitrógeno, fenoles, imidas, y compuestos inorgánicos, entre otros (Tabla 2) (Walker, 2001; Bejarano- González, 2002).

**Tabla 2.** Clasificación de los plaguicidas según varios criterios (tomado de Bejarano-González, 2002).

<b>Clasificación de plaguicidas según:</b>	
<b>Organismos que afectan:</b>	Acaricidas, fungicidas, herbicidas, insecticidas, larvicidas, molusquicidas, nematocidas, ovicidas, rodenticidas.
<b>Su composición química:</b>	Insecticidas: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides. Herbicidas: bipiridilos, triazinas, fenoxiacéticos, dinitrofenoles. Fungicidas: ditiocarbamatos, ftalimidas, fenoles, clorobencenos.
<b>Su origen:</b>	Naturales o sintéticos
<b>Su modo de acción contra plagas:</b>	De contacto, sistémicos, de ingestión ó estomacales, residuales.
<b>Su persistencia:</b>	Ligera, poca, moderada, alta, permanente
<b>Su toxicidad (DL50):</b>	I (Sumamente tóxico), II (muy tóxico), III (moderadamente tóxico), IV (poco tóxico)
<b>Su concentración industrial:</b>	Plaguicida de grado técnico ó formulado
<b>Su formulación:</b>	Polvos, granulados, concentrados, aerosoles, fumigantes, cebos envenenados

Las propiedades fisicoquímicas del plaguicida determinan su modo de acción y las consecuencias que el plaguicida puede tener sobre el ecosistema y organismos. Entre estas propiedades se pueden mencionar: el coeficiente de partición octanol- agua ( $K_{ow}$ ), la presión de vapor ( $P_v$ ), la constante de Henry ( $H$ ), el coeficiente de adsorción en suelos ( $K_{oc}$ ), la disociación e ionización, su degradabilidad, su volatilización, y su solubilidad en agua. Sin embargo, también hay que tomar en cuenta el modo, la frecuencia y el tiempo de exposición.

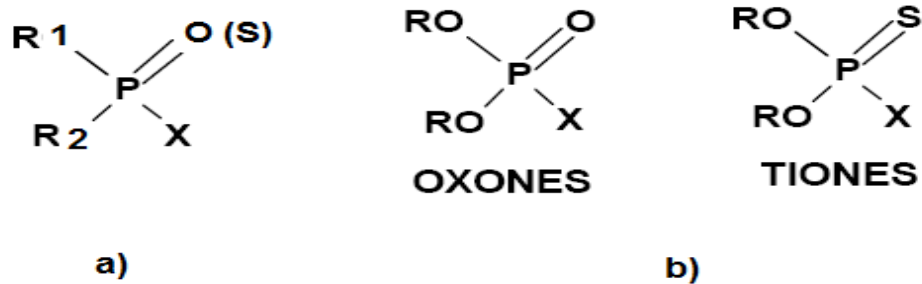
La toxicidad del plaguicida también se ve influenciada por factores ambientales (la temperatura, el pH, la radiación solar) y también por modo y tiempo de exposición, y por factores biológicos como: el estadio, el sexo, el ciclo reproductivo, el estado nutricional, entre otros (Van Leeuwen y Hermes, 1995; Landis y Yu, 2004). Las consecuencias ecológicas originadas por el uso de plaguicidas causa gran preocupación, debido al daño ambiental generado a causa de su toxicidad (letal o subletal) ya sea directamente en especies que no son blanco, o de manera indirecta, al afectar a organismos que sirven de alimento a otros mayores en la cadena alimenticia (Corbera *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Plaguicidas Organofosforados (OPs)

Los plaguicidas organofosforados fueron desarrollados durante la segunda guerra mundial, tanto como insecticidas así como armas químicas, entre los que se encuentran el tabún, el sarín y el schradán. Entre 1950 y 1960 aparecieron nuevos compuestos organofosforados, algunos de los cuales siguen vigentes hasta la fecha como el malatión y el paratión etílico (Bejarano-González, 2002).

Los plaguicidas OP son químicos que contienen átomos de carbono, oxígeno, fósforo y azufre, son derivados del ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ). Su fórmula

básica es la que se presenta en la figura 2a, en la cual R1 y R2, son grupos amino, alquilo, o alcoxil; X puede ser algún residuo ácido (Eto, 1974).



**Figura 2.** a) Estructura general de los plaguicidas organofosforados, b) Estructura de subclases de organofosforados (tomado Walker, 2001).

Cuando el átomo que se une al fósforo con el doble enlace que es el oxígeno, el compuesto se denomina oxón, el cual es un potente inhibidor de la colinesterasa, pero a su vez, en condiciones alcalinas, se favorece la hidrólisis del compuesto, debido a la posición del oxígeno. Para hacerlos más resistentes a la hidrólisis, se ha sustituido al oxígeno por un átomo de azufre, clasificando a los compuestos como tiones, los cuales aunque son pobres inhibidores de la colinesterasa, pueden atravesar la membrana celular más rápidamente que los oxones (Fig 2b). En el ambiente los tiones son convertidos en oxones por acción de la luz solar y el oxígeno en el organismo son convertidos principalmente por acción de las monooxigenasas presentes en el hígado (Walker, 2001).

Las vías de absorción de los organofosforados son oral, dérmica, e inhalación (Hurtado- Clavijo y Gutiérrez- Salazar, 2005). Una vez dentro del organismo, en general, son metabolizados por cuatro clases de reacciones: 1) reacciones que involucran las oxidasas de función mixta, 2) reacciones que

involucran hidrolasas, 3) reacciones transferasa, y 4) reacciones misceláneas. (Dauterman, 1971).

#### 2.2.2.1 *Modo de acción de plaguicidas organofosforados: Inhibición de acetilcolinesterasa.*

Numerosas esterasas pueden reaccionar con los organofosforados y carbamatos por diferentes vías. Desde el punto de vista toxicológico, las esterasas se clasifican en tres categorías (Mineau, 1991; Peakall, 1992; Repetto, 1995):

- ❖ *Esterasas A:* esterasas que hidrolizan ésteres con grupos arílicos, y pueden utilizar a los organofosforados como sustratos.
- ❖ *Esterasas B:* esterasas que hidrolizan ésteres con radicales alquílicos y se inhiben con los organofosforados en una reacción que es dependiente del tiempo y temperatura.
- ❖ *Esterasas C:* esterasas que prefieren ésteres acetato y no interactúan con los organofosforados.

El mecanismo de toxicidad más aceptado para los plaguicidas organofosforados y carbamatos implica la inhibición de esterasas tipo B como la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa. El grupo de las B esterasas se caracterizan por tener un grupo hidroxil serina en el sitio activo (Jokanovic, 2001; Domínguez *et al.*, 2010;). Actualmente las colinesterasas se clasifican dependiendo del sustrato de preferencia en dos grupos (Mineau, 1991; Jokanovic, 2001; Parveen y Kumar, 2005; Domínguez *et al.*, 2010):

- ❖ *Acetilcolinesterasa o acetilcolina acetilhidrolasa:* enzimas que preferentemente hidrolizan esterres acetil tal como la acetilcolina.

Se encuentran en el tejido nervioso y las células sanguíneas de mamíferos.

- ❖ *Butirilcolinesterasa o acilcolina acilhidrolasa*: enzimas que prefieren otros tipos de esteres tales como butirilcolina. También son conocidas como: pseudocolinesterasa, o colinesterasa no específica. Se encuentran en el plasma de vertebrados.

La acetilcolinesterasa (AChE) se localiza en membranas pre y post sinápticas, aunque también se ha reportado que realiza algunas funciones no colinérgicas, por ejemplo procesos de adhesión y diferenciación celular, y neurogénesis (Gupta, 2006). Esta enzima desempeña un papel importante en el mantenimiento de la función normal nerviosa, debido a que a través de hidrólisis, remueve el exceso del neurotransmisor acetilcolina de la hendidura sináptica y lo convierte en colina y ácido acético (Fulton y Key, 2001).

La acetilcolina (ACh) es uno de los principales neurotransmisores en el sistema sensorial y neuromuscular en la mayoría de las especies. Los impulsos nerviosos estimulan la liberación de acetilcolina, la cual transmite el estímulo a través de la hendidura hacia el nervio adyacente o músculo celular (Fulton y Key, 2001; Parveen y Kumar, 2005). En invertebrados el papel que desempeña la acetilcolina como neurotransmisor no ha sido claramente definido, sin embargo, los crustáceos tienen motoneuronas excitatorias e inhibitorias que usualmente emplean otros transmisores, por lo tanto, la acetilcolina parece funcionar principalmente como un neurotransmisor para las fibras nerviosas aferentes (Mineau, 1991).

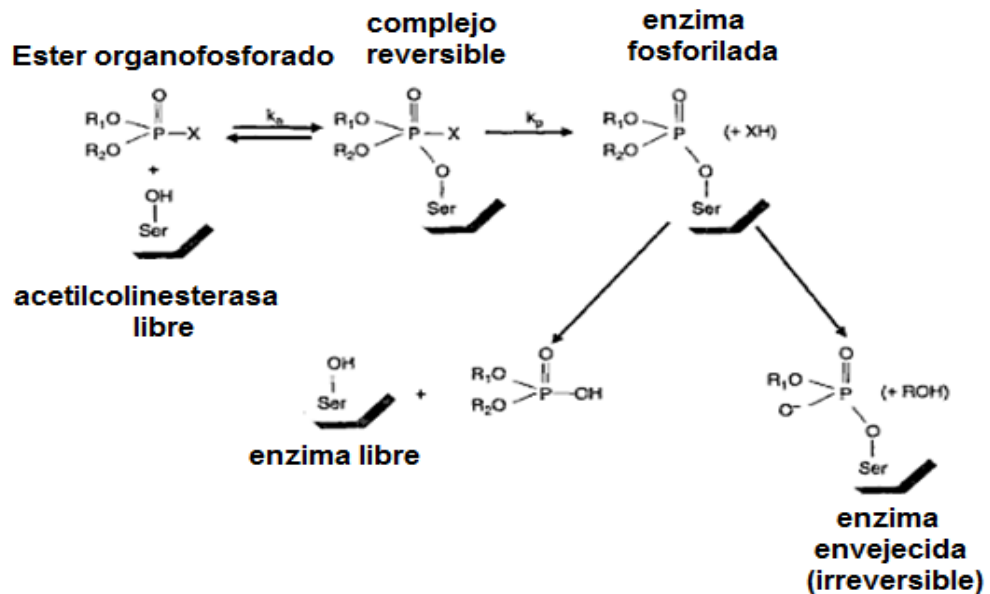
La toxicidad que ejercen los organofosforados y carbamatos se debe a que éstos sirven como pseudosustrato, por lo tanto, se unen al sitio activo de la enzima acetilcolinesterasa que es un grupo hidroxil serina, y lo fosforilan formando un complejo irreversible. Cuando ocurre la fosforilación se dice que la enzima acetilcolinesterasa está inhibida. La reactivación espontánea de la



enzima puede presentarse cuando la enzima es desfosforilada. Sin embargo, cuando la enzima es desalquilada, no se produce la reactivación espontánea provocando una inhibición permanente y se dice que esta reacción es conocida como envejecimiento, tal como se observa en la Figura 3 (Mineau, 1991).

Durante la inhibición de acetilcolinesterasa, se presenta una acumulación del neurotransmisor acetilcolina en la sinapsis (Domínguez *et al.*, 2010). Esto provoca una continua estimulación de neuronas colinérgicas, lo cual, a su vez, provoca una alteración de la función del sistema nervioso, debido a que produce rápidas contracciones de músculos voluntarios seguido por parálisis de órganos blanco, ya sea en vertebrados e invertebrados. Posteriormente, se da el deterioro de funciones nerviosas, respiratorias y musculares en los organismos expuestos, incluso en algunos casos la muerte, especialmente cuando la actividad de la enzima disminuye más del 50% (Mineau, 1991; Walker, 2001).

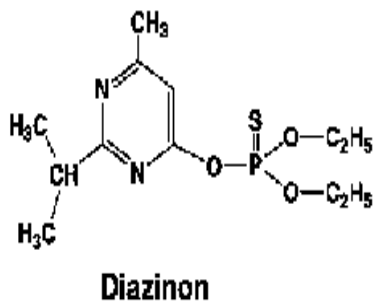
Los factores que causan la selectiva toxicidad del organofosforado para varias especies son el grado de inhibición de acetilcolinesterasa, así como la diferente destoxificación y absorción del compuesto (Svoboda *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Principal mecanismo de acción que ejercen los plaguicidas organofosforados: inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).

### 2.2.3 Plaguicida Organofosforado Diazinón

Un plaguicida ampliamente usado en la agricultura es el Diazinón O, O-dietil O-(6-metil-2-{1-metiletil}-4-pirimidinilfosforotioato,  $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$  (Fig. 4). Este plaguicida fue descubierto en 1952 por Gysin, pero fue registrado hasta 1956 para el control de insectos y plagas de frutas, vegetales, forrajes y campos cultivados, así como también en uso doméstico para el control de plagas (Eto, 1974). Basándose en la información disponible, la EPA (2004) reportó que de 1987 a 1997, el total anual de Diazinón uso doméstico en Estados Unidos, fue de más de 13 millones de libras de ingrediente activo y la mayor cantidad fue usado por propietarios de vivienda (39 %), jardineros (19 %), controladores de plagas (11 %) y uso agrícola (31 %).



**Tabla 3.** Propiedades físico- químicas Diazinón

<b>Punto ebullición:</b>	83- 84°C
<b>Punto de fusión:</b>	Se descompone >20°C
<b>Peso molecular:</b>	304.3
<b>Constantes de Disociación:</b>	
<b>Koc</b>	3.81
<b>Solubilidad:</b>	68.8 mg/ l a 20°C.
<b>Presión de vapor:</b>	$8.4 \times 10^{-5}$ mm Hg a 20°C.
<b>Constante Ley Henry:</b>	$1.13 \times 10^{-7}$ atm m <sup>3</sup> / mol calculado.

**Figura 4.** Estructura del Diazinón (Tomado de Galloway y Handy, 2003).

El Diazinón se degrada rápidamente, por tal motivo está clasificado como moderadamente tóxico (categoría III y IV) (CICOPLAFEST, 2004), sin embargo bajo condiciones de menor temperatura ( $\leq 20^\circ\text{C}$ ), baja humedad ( $< 60\%$  de la capacidad de campo), alta alcalinidad (pH 7-9) y falta de degradadores biológicos adecuados, puede permanecer biológicamente activo por seis o más meses (Aydin y Koprucu, 2005; Durmaz *et al.*, 2006).

El Diazinón tiene una amplia gama de usos, por lo cual puede ejercer su toxicidad sobre humanos, así como también para un gran intervalo de organismos no blanco, tales como invertebrados, peces, aves y mamíferos. Esto se debe a que después de su aplicación en cultivos y plantas, es fácilmente arrastrado hacia aguas subterráneas y aguas superficiales y de esta manera entra eventualmente al ambiente acuático en grandes cantidades (Pan y Dutta, 1998; Dutta y Meijer, 2003; Osterauer y Kohler, 2008).

La alta toxicidad y la poca especificidad que poseen los organofosforados, como el Diazinón, han originado preocupaciones acerca de sus potenciales efectos adversos en organismos no blanco (Xuereb *et al.*, 2009) y desafortunadamente, este plaguicida se ha encontrado recientemente

en áreas costeras y estuarinas de Sinaloa cercanas a valles agrícolas (González- Valdivia, 2007).

### **2.3 Sistema Inmunológico de crustáceos**

La función del sistema inmunológico es mantener la individualidad biológica protegiendo a los organismos multicelulares de agentes extraños. Este sistema se clasifica en inmunidad innata ó natural e inmunidad adaptativa ó adquirida. El sistema inmunológico innato, a su vez, se divide en respuestas humorales y celulares, que en conjunto reconocen y destruyen el material no propio. Los crustáceos, como los camarones peneidos, presentan solamente un eficiente sistema inmunológico innato en la hemolinfa (Lee y Soderhall, 2002), dentro de la cual, los hemocitos circulantes son los responsables de las respuestas innatas humorales y celulares, removiendo los patógenos u otras partículas extrañas (Li *et al.*, 2009).

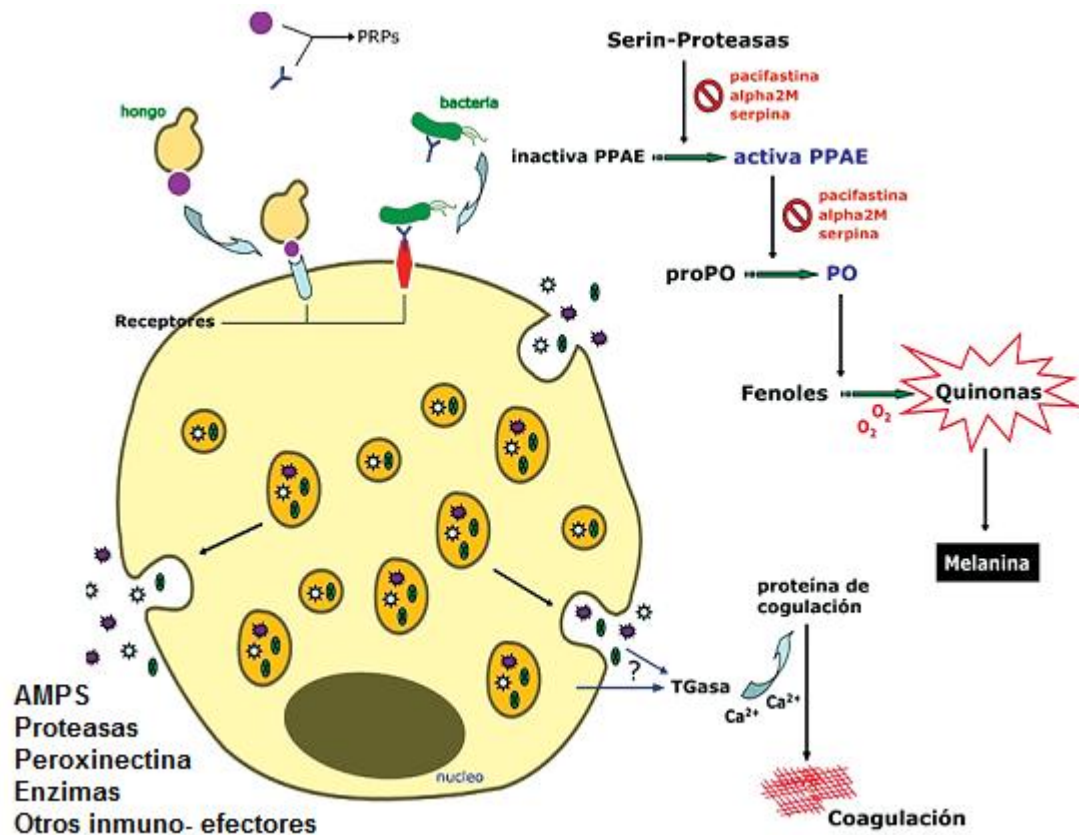
Las respuestas celulares inmunes involucran diferentes tipos de hemocitos, los cuales participan en la eliminación de patógenos por medio de actividades como la fagocitosis, la encapsulación, la formación de nódulos, y reacciones citotóxicas. Por otro lado, las respuestas humorales incluyen proteínas anticoagulantes, aglutininas, profenoloxidasa, péptidos antimicrobianos (AMPs), inhibidores de proteasas, ROS, entre otros (Holmblad y Söderhäll, 1999; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

La entrada del material extraño (ya sean patógenos ó contaminantes) ocurre a través de la alimentación, pero también se ve favorecido cuando el organismo presenta heridas ó durante el proceso de muda, aprovechando el desprendimiento de la cutícula, la cual es una superficie externa, dura y resistente que sirve como barrera para evitar la entrada de patógenos al

hemocele (Holmblad y Soderhall, 1999). Una vez que el material extraño ha sobrepasado la cutícula, el sistema inmunológico es activado por patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglucanos (PG) Y  $\beta$ -1-3- glucanos ( $\beta$ G), que están presentes en la superficie celular de bacterias y hongos, respectivamente (Fig. 5) (Lee y Soderhall, 2002).

Los PMAP se unen a receptores presentes en la superficie de los hemocitos, llamados proteínas receptoras de patógenos (PRP); cuando se presenta este enlace, los hemocitos semigranulares son los primeros que reaccionan mediante exocitosis y de esta manera liberan componentes del sistema proFO, así como también ciertas proteínas, como la peroxinectina, la cual participa en adhesión celular y tiene actividad opsónica y peroxidativa (Johansson y Soderhall, 1989; Le Moullac y Haffner, 2000).

La peroxinectina se activa al ser liberada por los hemocitos semigranulares en la hemolinfa e induce a los hemocitos granulares para que se desgranulen y liberen los componentes del sistema proFO. Además, esta proteína provoca que los hemocitos hialinos realicen la primer respuesta celular que es la fagocitosis. Cuando los microorganismos son grandes y no pueden ser fagocitados, se promueve la encapsulación, donde los hemocitos forman varias capas envolviendo al patógeno, para aislarlo y posteriormente destruirlo a través de moléculas tóxicas (Vargas-Albores y Barracco, 2001). Cuando los microorganismos están presentes en grandes concentraciones, el sistema proFO es activado y frecuentemente los nódulos o cápsulas formadas se melanizan por la activación de este sistema (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).



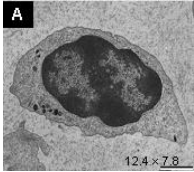
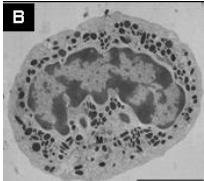
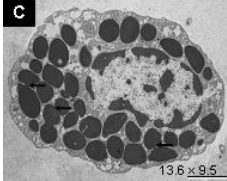
**Figura 5.** Activación del sistema inmunológico ante la presencia de patógenos y activación del sistema profenoloxidasa (tomado de Morales y Cuéllar-Anjel, 2008).

### 2.3.1 Hemocitos

Los hemocitos desempeñan una importante función en la defensa inmunológica de los invertebrados. Estas células protegen a los organismos contra microorganismos invasores participando en el reconocimiento, fagocitosis, melanización y citotoxicidad (Cerenius y Soderhall, 2004). Son transportadas desde el tejido hematopoyético (lugar donde son producidos), hasta la hemolinfa y otros tejidos, mediante el sistema de circulación abierto que presenta el camarón.

En crustáceos decápodos las reacciones inmune celulares comprenden tres tipos de hemocitos circulantes: células hialinas (HH), células semigranulares (HSG), y células granulares (HG). Sus características de acuerdo a su morfología y funciones se muestran en la tabla 4.

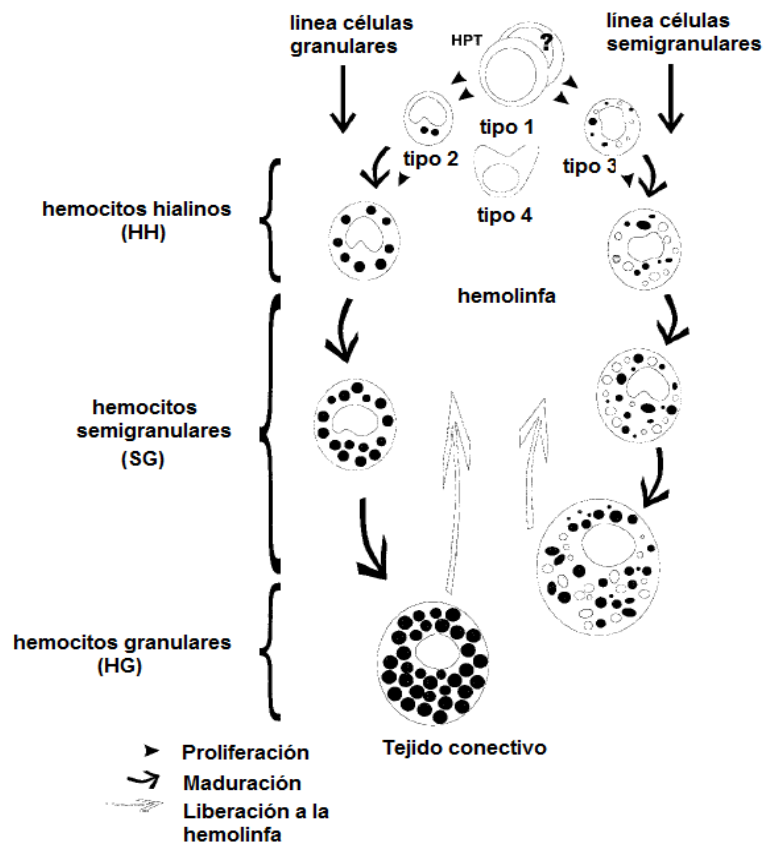
**Tabla 4.** Los diferentes tipos de hemocitos, sus características y función

Tipo de célula		Características	Función
<b>Hemocitos Hialinos (HH)</b>		Ausencia de gránulos. Núcleo amplio No son refringentes	Tienen capacidad fagocítica
<b>Hemocitos Semigranulares (HSG)</b>		Gránulos pequeños Núcleo esférico o en forma de herradura Poca refringencia	Poca actividad fagocítica Participan en la encapsulación Reaccionan primero durante la respuesta inmune, y estimulan a los granulares por la liberación de proteínas (76kDa ó peroxinectina entre otras) y componentes del sistema profenoloxidasa (ppa y proFO)
<b>Hemocitos Granulares (HG)</b>		Muchos gránulos grandes Núcleo y forma esférica Mucha refringencia	Liberan componentes del sistema profenoloxidasa (la enzima activadora inactiva de la fenoloxidasa ppA y la enzima inactiva proFO)

**Referencias:** Soderhall y Cerenius, 1992; Bachere *et al.*, 1995; Holmblad y Soderhall, 1999.

El número de hemocitos libres puede variar y en el caso de infecciones, estos pueden disminuir dramáticamente, de esta manera es necesario que nuevos hemocitos compensen esas disminuciones, por lo tanto son liberados continuamente del tejido hematopoyético (Johansson *et al.*, 2000). La hematopoyesis es el proceso por el cual los hemocitos se producen y subsecuentemente entran en la circulación. El proceso de formación y

maduración de hemocitos no es muy claro; sin embargo Van de Braak *et al.*, (2002) mencionan que en el tejido hematopoyético se encuentran las células precursoras de los diferentes tipos de hemocitos, que son considerados los hemocitos jóvenes. Cuando son liberados dentro de la hemolinfa, los hemocitos jóvenes, conocidos como hialinos, se desarrollan y se convierten en hemocitos semigranulares; posteriormente una proporción de estos son transportados al tejido conectivo donde maduran y se convierten en hemocitos granulares (Fig. 6).



**Figura 6.** Diagrama que representa el proceso de maduración de hemocitos (tomado de Van de Braak *et al.*, 2002).



### 2.3.2 Sistema profenoloxidasa

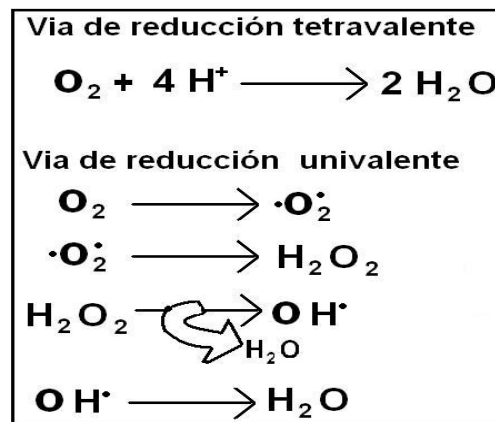
Una de las principales respuestas inmunológicas en crustáceos es la melanización de patógenos y tejidos dañados, que además puede funcionar como atrapador de radicales libres (Vázquez *et al.*, 1998). Este importante proceso es controlado por la ruta de activación de la proFO, la cual es una cascada de fenoloxidación que comprende patrones de reconocimiento de proteínas, varias serinas- proteasas, sus inhibidores y los zimógenos de proFO. El producto final de esta cascada es la melanina, la cual es un pigmento oscuro, que continuamente puede observarse en la cutícula.

En la mayoría de los crustáceos, la activación del sistema profenoloxidasa es efectuada principalmente por los hemocitos granulares y en menor proporción por los hemocitos semigranulares; ambos tipos de hemocitos, por medio de exocitosis liberan los componentes de este sistema, tales como el zimógeno profenoloxidasa (proFO) y la enzima activadora del sistema profenoloxidasa (ppA) (Johansson y Soderhall, 1989). La ppA es una serina- proteasa que después de ser liberada en la hemolinfa, puede activarse por medio de los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), convirtiendo la proFO a su forma activa fenoloxidasa (FO) (Soderhall y Cerenius, 1998).

La fenoloxidasa (FO; monofenol dihidroxifenilalanina) inicia una serie de reacciones, entre ellas la hidroxilación de monofenol a o- difenol (actividad monofenoloxidasa) y posteriormente participa en la oxidación de o- difenol a o- quinona (actividad difenoloxidasa). La producción de o- quinonas es importante para la esclerotización cuticular, curación de heridas y encapsulación, y es un paso inicial de una cascada de reacciones bioquímicas no mediadas por enzimas que dan como producto final la melanina (Lee y Soderhall, 2002).

## 2.4 Estrés Oxidativo

En los organismos aeróbicos, la mayor parte del oxígeno molecular experimenta una reducción tetravalente hasta formar agua. Sin embargo la reducción parcial por medio de varios procesos endógenos conduce a la producción constante de pequeñas cantidades de diferentes especies oxigenadas altamente reactivas llamadas oxiradicales, los cuales comprenden tanto radicales como especies no radicales. Se ha estimado que aproximadamente del 1 al 3 % del oxígeno consumido por los organismos es convertido a ROS (Fig. 7) (Livingstone, 2001).



**Figura 7.** Reducción tetravalente del oxígeno y las principales especies reactivas formadas.

Los ROS son radicales de oxígeno que poseen electrones libres o no pareados en su órbita más externa, lo que les confiere una elevada capacidad de reaccionar con estructuras y compuestos, tales como: los lípidos, las proteínas, los carbohidratos y los nucleótidos los cuales son importantes constituyentes de membranas, enzimas y ADN respectivamente (Song *et al.*, 2003).

Cuando la producción de ROS excede la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante en los organismos se produce estrés oxidativo. Esto también sucede cuando los organismos se encuentran expuestos a contaminantes con diferentes grados de toxicidad ocasionando efectos adversos y enfermedades a los organismos.

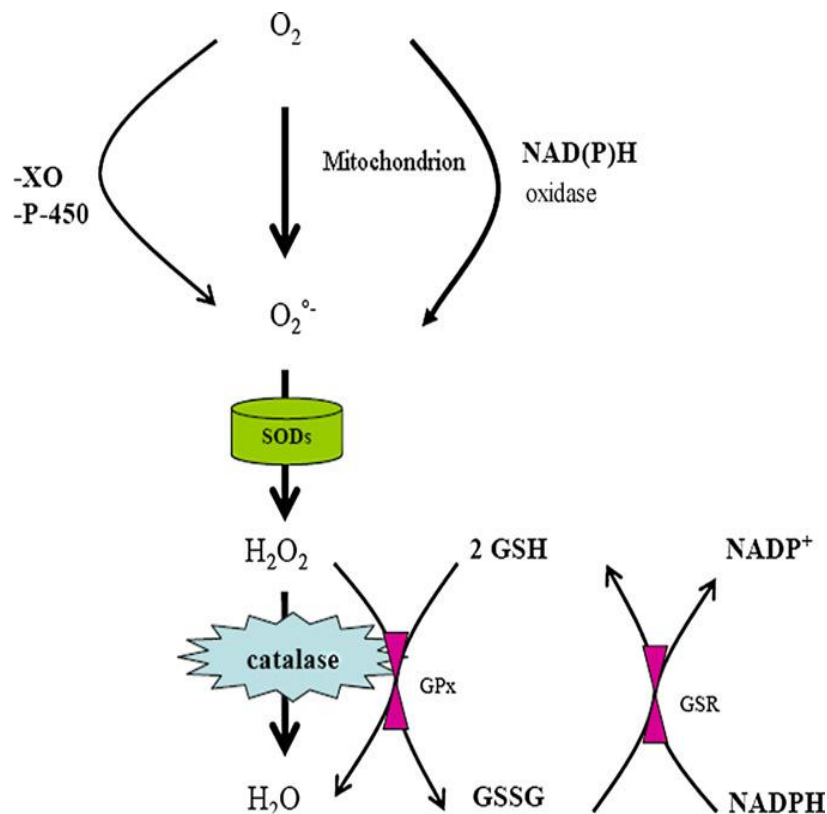
Dentro de los principales ROS se incluyen anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxil ( $OH\cdot$ ), radical peroxil ( $RO_2$ ), radical alcoxil ( $RO$ ), radical hidropoxil ( $HO_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), oxígeno singulete ( $O_2\cdot$ ) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Todas estas especies reactivas de oxígeno comúnmente sirven como mensajeros en funciones celulares normales, ya que intervienen en la respiración, y además participan en reacciones de defensa (Campa- Córdova *et al.*, 2002). El radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ) es uno de los oxidantes más potentes, capaz de reaccionar con muchas moléculas orgánicas, como: las macromoléculas celulares, la degradación de proteínas, la inactivación enzimática, la peroxidación de lípidos, los daños al ADN y por último la muerte de la célula (Winston y Di Giulio, 1991).

Las enzimas antioxidantes tienen un papel crucial en mantener la homeostasis celular. Estos sistemas se encargan principalmente de mantener el balance entre la producción y la eliminación de los ROS. Dichos sistemas pueden ser inducidos después de exposición a contaminantes, reflejando una adaptación de las especies a su ambiente (Doyotte *et al.*, 1997).

Los antioxidantes se clasifican tres grupos que son (Afonso *et al.*, 2007) (Fig. 8):

- ❖ Enzimas antioxidantes como: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la Glutación peroxidasa (Gpx), la Glutación reductasa (Grx), entre otras.
- ❖ Antioxidantes hidrosolubles como: el Glutación (GSH), la vitamina C y el ácido úrico.

- ❖ Antioxidantes liposolubles como: la vitamina E, los carotenoides y la bilirubina.



**Figura 8.** Principales enzimas antioxidantes involucradas en el mantenimiento del balance redox (tomado de Afonso *et al.*, 2007). XO= xantina oxidasa, P-450= monooxigenasas P-450, GPx= Glutatión peroxidasa, GSH= glutatión, GSSG= glutatión oxidado, GSR= glutatión reductasa.

Los ROS tienen poderosa actividad microbicida. Este proceso es conocido como estallido respiratorio y el anión superóxido es el primer producto de este proceso (Muñoz *et al.*, 2000). En los crustáceos, el estallido respiratorio es producido por la estimulación de partículas fagocíticas o por la presencia de PMAP, como los lipopolisacáridos o los beta glucanos. La estimulación conduce a un elevado consumo de oxígeno, el cual es producto de la reducción

catalizada por una enzima unida a la membrana, NADPH oxidasa, dando el anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y posteriormente por medio de varias reacciones se produce  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot}$ ,  $OH^{\cdot}$  y otros productos (Pipe, 1992; Muñoz *et al.*, 2000).

#### 2.4.1 Enzima antioxidante Superóxido Dismutasa (SOD)

La enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD) es una enzima que posee la capacidad de dismutar el anión superóxido en 2 pasos, para generar el peróxido de hidrógeno y agua. Las SODs son un grupo de metaloenzimas que se clasifican en tres grupos, dependiendo de su ión metálico (Campa- Córdova *et al.*, 2005):

- ❖ Mn-SOD: presente en las mitocondrias, y utiliza el manganeso como cofactor. Proporciona protección contra los ROS generados por hiperoxia.
- ❖ Fe-SOD: presente en bacterias.
- ❖ Cu/ZN-SOD: presente en eucariotas. Esta se subdivide en:
  - Citosólica: tiene un papel central en supervivencia celular y crecimiento. Responde a varias fuentes de estrés.
  - Extracelular (EC-SOD): participa en la destrucción de microorganismos ingeridos o encapsulados durante el estallido respiratorio.



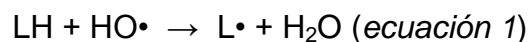
**Figura 9.** Dismutación del radical hidroxilo en peróxido de hidrógeno y agua.

Todas las familias de la SOD tienen un mecanismo similar, en el cual el metal del sitio activo es reducido por un anión superóxido y posteriormente es reoxidado por el siguiente anión superóxido. Por lo tanto, el sitio activo del metal (ya sea manganeso, hierro, cobre, ó zinc) actúa como mediador pasando un electrón de un  $O_2^{\cdot-}$  al siguiente (Fridovich, 2004).

#### 2.4.2 Peroxidación lipídica

La peroxidación de lípidos es uno de los procesos más estudiados que son inducidos por radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno reaccionan fácilmente con los fosfolípidos de la membrana, especialmente con los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, por sus siglas en inglés), que son altamente susceptibles a reacciones de oxidación. La peroxidación de lípidos conduce a una serie de reacciones en cadena generando gran cantidad de productos que son muy sensibles a reacciones de oxidación (Barata *et al.*, 2005), algunos de ellos reaccionan con proteínas y ADN.

Los lípidos oxidados pueden iniciar una cadena de reacciones que finalmente dan como resultado el daño oxidativo. En este proceso se distinguen tres fases que son: iniciación, propagación, y terminación. Durante la fase de iniciación, se forma un radical orgánico ( $L\cdot$ ) debido a la interacción del radical hidroxilo con el ácido graso poliinsaturado. Una vez formado el radical orgánico, comienza la fase de propagación (Ec. 1).



L H = ácido graso poliinsaturado

$L\cdot$  = radical orgánico

En la fase de propagación el radical orgánico puede combinarse o adicionarse con el oxígeno formando radicales peroxil lipídicos ( $LOO\cdot$ ) (Ec. 2)

Estos LOO•, tienen la capacidad de captar un átomo de hidrógeno de la molécula lipídica siguiente y de esta manera se forman los hidroperóxidos (LOOH) (Ec. 3).



La fase de terminación de la peroxidación de lípidos es el resultado de interacciones de radicales con los lípidos y/ o la formación de especies no radicales como los hidroperóxidos lipídicos por los radicales peroxil lipídicos. El hidroperóxido lipídico formado (LOOH) se descompone fácilmente en varias especies reactivas como los radicales alcoxil lipídicos (LO•), aldehídos como el malondialdehído (HOC-CH<sub>2</sub>-CHO), alcanos, epóxidos lipídicos y alcoholes (Esterbauer *et al.*, 1991; De Zwart *et al.*, 1999).

### III. ANTECEDENTES

La acuicultura del camarón tuvo sus inicios en 1970, como una actividad industrial y se desarrolló rápidamente. La camaronicultura se lleva a cabo en países tropicales en el sureste de Asia, en países como México y países del centro y sur de América (Bachere, 2000). En México, la mayoría de las granjas de camarón están localizadas en el noroeste, en estados como Baja California y Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit, donde hay cerca de 250 granjas de camarón construidas en la costa de sistemas estuarinos-lagunares donde hay un importante suplemento de agua de mar o salobre (Páez-Osuna *et al.*, 2003).

En la actualidad, la producción generada por acuicultura es afectada por problemas relacionados con la degradación ambiental y puede tener un impacto negativo en la salud del camarón cultivado (Lightner, 1998), debido a que favorece la prevalencia de enfermedades infecciosas causadas por agentes vivos como bacterias, virus y hongos. Así mismo enfermedades no infecciosas causadas por contaminantes de actividades industriales, asentamientos humanos y escorrentías agrícolas (Bachere, 2000; Graslund, y Bengtsson, 2001).

En la costa noroeste de México se encuentran cinco importantes valles agrícolas como lo son Mexicali, Yaqui, Mayo, Del Fuerte y Culiacán, donde se aplica una gran cantidad de plaguicidas, por lo tanto, los plaguicidas son uno de los contaminantes que pueden ser peligrosos para las granjas de camarón (Páez- Osuna *et al.*, 1998).

El estado de Sinaloa es uno de los estados más activos de México en cuanto a agricultura se refiere por el valle agrícola de Culiacán, sin embargo, hay poca restricción y control gubernamental en cuanto al uso de plaguicidas



(Galindo-Reyes *et al.*, 2002). En algunos estudios realizados en zonas costeras del estado se ha comprobado la presencia de diversos tipos de plaguicidas organofosforados en sedimentos, lo cual causa gran preocupación debido a que estos compuestos generalmente se degradan rápidamente.

González-Valdivia, 2008 caracterizó los tipos de plaguicidas utilizados frecuentemente en el área del valle agrícola de Culiacán, para ello se tomaron muestras de sedimentos de diferentes granjas en Octubre del 2006 y Marzo del 2007. En ambos muestreos los resultados indicaron que los organofosforados se encontraron en más altas concentraciones, siendo el Diazinón uno de los compuestos más frecuentes y presentó las concentración más alta (774.27 y 628.64 ng / p peso seco), sobrepasando los límites permisibles. Así mismo; Cervantes Mojica, 2008, analizó sedimentos de la parte baja y alta de diferentes drenes agrícolas en la zona costera de Ensenada del Pabellón, reportando altas concentraciones de Diazinón (347.87 ng/ g peso seco).

Con la constante presencia de Diazinón en los ecosistemas costeros, los organismos pueden estar expuestos a concentraciones subletales del plaguicida y así debilitar de alguna manera el sistema inmunológico causando disminución en su crecimiento y reproducción, cambios en el comportamiento ó en los hábitos de alimentación, y finalmente favorecer los patógenos oportunistas.

La concentración letal media (CL50) de Diazinón varía extensamente entre las especies, ya que depende de la etapa de vida del organismo, el peso, el sexo, así como también de las condiciones climáticas. Algunas CL50 de Diazinón en diferentes especies acuáticas se presentan a continuación (Tabla 5):

**Tabla 5.** Valores de toxicidad aguda (LC50) del Diazinón en diferentes especies.

Especie		24h	48h	72h	96h	Referencia
Invertebrados	<i>C. dubia</i>		0.92 µg/l			(2)
	<i>D. magna</i>		2.39 µg/l			(2)
	<i>H. azteca</i>		15.07 µg/l			(2)
	<i>C. tentans</i>		52.47 µg/l			(2)
	<b><i>L. vannamei</i></b>	<b>0.0741</b> <b>mg/l</b>	<b>0.0207</b> <b>mg/l</b>			(1)
	<i>C. laevis</i>	0.76 µg/l			0.59 µg/l	(7)
Vertebrados	<i>P. promelas</i>		15,940 µg/l			(2)
	<i>Silurus glanis</i>	12.487 mg/l	8.932 mg/l	6.326 mg/l	4.142 mg/l	(5)
	<i>O. niloticus</i>				7.830 ppm	(6)
	Larvas	3.688 mg/l	2.903 mg/l	2.358 mg/l	1.530 mg/l	(4)
	<i>C. carpio</i>				26.7 mg/l	(3)
	Juveniles					

(1) Osuna *et al.*, 1997; (2) Bukerpile *et al.*, 2000; (3) Svoboda *et al.*, 2001; (4) Aydin y Koprucu, 2005; (5) Koprucu *et al.*, 2006; (6) Girón-Pérez *et al.*, 2007; (7) Sucahyo *et al.*, 2008.

Los camarones son más sensibles a los efectos tóxicos en comparación con otros organismos, debido a la relación filogenética que tienen con los insectos (Hatakeyama y Sugaya, 1989). Sin embargo, la información en cuanto al plaguicida Diazinón en camarón es escasa y se enfoca principalmente a la concentración letal media (CL50) como el de Sucahyo *et al.* (2008) con la especie *C. laevis*, y Osuna *et al.*, (1997) con la especie *L. vannamei*.

No obstante a lo anterior, existen una gran variedad de estudios de laboratorio con diversas especies de camarón expuestos a plaguicidas organofosforados que demuestran cambios en los procesos fisiológicos tales como actividad enzimática, metabolismo oxidativo, consumo de oxígeno, osmorregulación entre otros. Algunos de ellos se presentan a continuación:

El camarón del Pacífico *L. vannamei*, se utilizó para probar la toxicidad aguda y subletal del Tilt, el cual es una formulación comercial del fungicida Propiconazol. Los organismos se expusieron a toxicidad aguda durante 10 días y toxicidad subletal durante 32 días; además se determinó la concentración letal media (CL50) para diferentes tiempos de exposición. Los resultados presentaron una CL50 24 h de 1167 µg/ l y una concentración umbral de CL50 a las 72 h de 1043 µg/ l. La exposición subletal fue realizada con concentraciones de Propiconazol en un intervalo de 367 a 825 µg/ l. Los organismos en la mayoría de los tratamientos presentaron un incremento significativo en la duración de intermuda comparado con aquellos del grupo control, aunque no se vio una respuesta dependiente de la concentración. Los camarones expuestos a concentraciones subletales de este fungicida presentaron deformidades morfológicas, con una correlación significativa entre la concentración y las deformidades del rostrum, pereópodos y urópodos. En general, los resultados indican que los efectos potenciales del Tilt en el camarón, se dan particularmente en un largo tiempo de exposición (Betancourt-Lozano *et al.*, 2006).

Se evaluaron los efectos subletales del metilparatión (0.62 y 1.31 µg de metilparatión / g peso seco de alimento) en respuestas bioquímicas (AChE) y fisiológicas (intervalo de alimentación, de egestión, e índice hepatosomático) en juveniles de *L. vannamei*. El intervalo de alimentación fue menor en los controles que en los tratamientos, contrario a lo que sucedió con el índice hepatosomático, donde los controles presentaron valores significativamente altos comparados con los tratamientos. Mientras que para el intervalo de egestión no se obtuvieron diferencias significativas entre el control y los tratamientos. En cuanto a la actividad de AChE, en los controles se presentaron valores significativamente más altos que en los tratamientos. Los resultados de este estudio, muestran que el metilparatión puede provocar efectos adversos en el camarón. Además la exposición por alimentación puede ser un procedimiento

toxicológico que ayude a simular escenarios de exposición más realísticos (Comoglio *et al.*, 2005).

Roque *et al.*, (2005), realizaron un estudio con la finalidad de investigar la susceptibilidad de *L. vannamei* a la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*, cuando es expuesto a metilparatión. Determinaron una concentración subletal a 96 h que fue de 1.56 µg/ g esta concentración fue usada en el experimento de susceptibilidad, donde los camarones recibieron el metilparatión y posteriormente, fueron inyectados con la bacteria *V. parahaemolyticus*. Los datos obtenidos demuestran que existe una correlación entre la actividad de AChE y la mortalidad. La concentración de 0.1 µg/ g causó una inhibición de 57.12 %. Y las mortalidades acumuladas aumentaron en los tratamientos que combinan la exposición al tóxico y la bacteria en comparación con los que tienen sólo el tóxico ó la bacteria.

Galindo- Reyes *et al.*, (2000) expusieron al camarón *L. vannamei* a los plaguicidas: DDT (2 µg/ l), Lindano (0.45 µg/ l), Lorsban (4 µg/ l), Gusatión (10.1 µg/l), Folidol (7.5 µg/ l), y Diazinón (12 µg/ l). Posteriormente a las 24 h post exposición, realizaron pruebas enzimáticas (AChE) y de osmorregulación con 50, 30 y 10 ‰. De las pruebas enzimáticas se obtuvo una actividad de acetilcolinesterasa reducida en los camarones expuestos a todos los plaguicidas con valores entre 11 a 2 unidades/ ml. Mientras que la osmorregulación a 50 ‰, fue reducida en los plaguicidas organoclorados (DDT, Lindano, Lorsban), y por lo contrario, incrementó en los plaguicidas organofosforados (Diazinón, Folidol, y Gusatión). En la menor salinidad (10 ‰) todos los plaguicidas excepto el DDT, disminuyeron la capacidad de osmorregulación; y para las 30 ‰, no se observaron diferencias significativas entre organoclorados y organofosforados.

En el camarón blanco *L. vannamei* se evaluó la producción de aniones superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) producidos por los hemocitos ante la presencia de bacterias y

un químico. En primer lugar, se establecieron parámetros óptimos como el número de hemocitos, tipo de medio de incubación, tipo y concentración de estimulantes, entre otros. Los resultados muestran que los hemocitos que recibieron experimentalmente un estimulante, presentaron una alta actividad basal. Usando inhibidores específicos, las actividades variaron fuertemente entre individuos. Mientras que el efecto del camarón ante una cepa de *V. anguillarum* y una cepa de *V. alginolyticus* presentaron claras reacciones, en la producción de  $O_2^{\bullet-}$ . Una cepa de *V. harveyi*, no provocó la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en los hemocitos. Por su parte, el fungicida Propiconazol ó Tilt provocó una reducción del nitroblue tetrazolio de manera dependiente de la dosis. Sin embargo cuando se adicionó estimulante PMA el Tilt redujo significativamente la reacción (Muñoz *et al.*, 2000).

Galindo-Reyes y colaboradores (1996) realizaron un estudio para evaluar los efectos de toxicidad de algunos plaguicidas en el camarón *L. vannamei*, los cuales fueron expuestos a Clordano, DDT, Lorsban y Lindano para estimar la concentración letal 50 (CL50) a 48h. Las CL50 fueron: 0.00632, 0.0087, 0.0048 and 0.0039 mg/ l respectivamente, para cada plaguicida. Los camarones tratados con concentraciones subletales de plaguicidas presentaron cambios en la respiración y en la cantidad de proteína, de lo cual se obtuvo que el porcentaje de proteína de los camarones expuestos disminuyó 28.5, 41.8, 36.9, y 37.6 para los camarones expuestos a Clordano, DDT, Lorsban y Lindano, respectivamente, además los camarones tratados con plaguicidas registraron un aumento en la respiración comparado con los controles.

Estos resultados en conjunto indican que la contaminación por plaguicidas representa un peligro potencial para la pesca y acuicultura del camarón en Sinaloa.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Dado que el sistema inmune de los camarones es considerado el principal sistema de defensa ante estresores y posee un sistema colinérgico, entonces la exposición previa a componentes anticolinérgicos (como los organofosforados) debilitará el sistema de defensa.

La exposición a organofosforados podría afectar la capacidad del sistema antioxidante para contrarrestar el estrés oxidativo.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto inmunotóxico en juveniles de *L. vannamei* por su exposición al plaguicida organofosforado Diazinón.

### 5.2 Objetivos Particulares

- 1) Calcular la dosis letal media (DL50) del Diazinón en juveniles de *L. vannamei*.
- 2) Evaluar el efecto de la exposición al organofosforado Diazinón en la hemolinfa y músculo de *L. vannamei*, mediante la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE).
- 3) Evaluar las respuestas del sistema inmune por medio de la actividad de la Fenoloxidasa y el recuento total y diferencial de hemocitos.
- 4) Evaluar el sistema antioxidante mediante la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), como una respuesta ante la presencia del plaguicida.
- 5) Evaluar la peroxidación de lípidos como un indicador de estrés oxidativo.

## VI. METODOLOGIA

### 6.1 Organismos de Estudio

Los organismos juveniles de *L. vannamei* (12-15 g) fueron obtenidos de un laboratorio comercial, y se trasladaron al laboratorio de bioensayos del CIAD Mazatlán en un tanque de fibra de vidrio con aireación constante, agua a 34 ‰, y a 27°C. Posteriormente, al llegar a la sala de bioensayos, se distribuyeron en tres tanques de fibra de vidrio con capacidad de 250 l. Los tanques fueron continuamente suministrados con agua de mar filtrada, a las mismas condiciones de temperatura y salinidad, irradiada con UV, y un fotoperiodo de 12 h luz, 12 h oscuridad. Diariamente se realizó un intercambio de agua del 75%.

Los camarones fueron alimentados diariamente dos veces (2% de su biomasa) con una dieta de alimento comercial con 40% de proteína (API-CAMARON, Malta Cleyton). Los restos de alimento y las heces fecales fueron removidos diariamente por sifoneo, al mismo tiempo que hacía recambio de agua.

Previo a cada experimento, los camarones fueron aclimatados una semana en acuarios conservando las condiciones anteriores.



## 6.2 Bioensayos Preliminares

### 6.2.1 Selección de Técnicas para Inocular el Tóxico

Los procedimientos de inoculación estandarizados permiten comparar la susceptibilidad de los organismos, y a su vez, determinar el efecto del tóxico a diferentes niveles de organización biológica. Numerosos estudios han utilizado métodos de intoxicación en crustáceos como son: 1) ruta intramuscular, 2) ruta inmersión y 3) ruta oral (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2006).

Las rutas orales representan la vía natural de introducción del tóxico en los organismos, por este motivo, en algunos estudios se han propuesto dos técnicas de exposición, como lo son:

- a) por ingestión, mediante alimento contaminado (pellets)
- b) por intubación, mediante introducción directa del tóxico en la boca del organismo.

Sin embargo, en las pruebas para intoxicar a los organismos con alimento contaminado, la cantidad de tóxico tomado por cada organismo puede variar. Esto se debe a que cada organismo ingiere diferente cantidad de alimento, lo cual hace difícil la comparación de resultados entre diferentes estudios.

A diferencia de la técnica anterior, la técnica de intubación, además de ser fácil y rápida, hace posible que los organismos reciban la misma cantidad de inóculo, debido a que la dosis deseada se da directamente en la boca del organismo (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2005). Por lo tanto, para todas las pruebas de intervalo de toxicidad así como para el bioensayo final, se seleccionó la técnica por intubación.

Se ensayaron diferentes artefactos para introducir el tóxico en la boca del organismo. Primero se probaron puntas de micropipeta y se descartaron debido a que son rígidas y podrían ocasionar daño a la boca del organismo. Posteriormente se probaron diferentes cánulas, pero éstas tampoco fueron favorables debido a que eran más anchas que la cavidad bucal del organismo y esto hacía difícil la incorporación del tóxico.

Finalmente, se adaptó una pipeta de plástico, previamente calentada y alargada para obtener una punta muy delgada y flexible. Para observar si la solución ingresaba al organismo se introdujeron 50 µl de solución salina (PBS, ver anexo II) con un colorante. Debido a que el cuerpo del camarón es transparente, al introducir la solución anterior se observó el color en el área de la cabeza. Para tener control sobre la dosis, se tomaron 50 µl de solución de prueba con una micropipeta, y se colocaron en un tubo eppendorf; posteriormente los 50 µl de solución se tomaban con la pipeta adaptada, y se proporcionaron a los organismos directamente en la cavidad bucal.

### 6.2.2 Estandarización de las Técnicas para Evaluar Biomarcadores

Las respuestas inmunológicas, como el recuento total y diferencial de los hemocitos (RTH y RDH respectivamente) fueron evaluadas en hemolinfa, mientras que las actividades enzimáticas: fenoloxidasa (FO), acetilcolinesterasa (AChE), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidación de lípidos (LPO) fueron evaluadas en el plasma (apartado 6.5 y 6.6). La AChE también se evaluó en músculo.

### 6.2.2.1 Actividad de acetilcolinesterasa (AChE)

La enzima acetilcolinesterasa (AChE) es la responsable de hidrolizar la acetilcolina dentro la sinapsis nerviosa durante la transmisión de los impulsos nerviosos. Cuando está presente un organofosforado o carbamato, esta enzima es inhibida, dándose un aumento de acetilcolina, lo que provoca una transmisión prolongada de impulsos nerviosos, que en algunos casos causan la muerte del organismo (Peakall, 1992).

Para la evaluación de la AChE se siguió la metodología de Ellman *et al.*, (1961) adaptada a microplaca por Guilhermino *et al.* (1996). La actividad de AChE en hemolinfa se evaluó directamente en el plasma, mientras que para músculo se hizo una dilución 1:2, del sobrenadante con buffer fosfatos 50 mM, pH 7.4 (apartado 6.6 para obtención de plasma y sobrenadante).

Para ambas muestras (plasma y sobrenadante), la actividad de la enzima se analizó por triplicado. Primero se colocaron 50 µl de la muestra en cada celda de la microplaca, luego se agregaron 150 µl de Solución 5, 5-ditiobis (2-acido nitrobenzoico) DTNB 270 µM y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, con una pipeta multicanal se agregaron 50 µl de solución acetilcolina 3 mM a cada celda de la microplaca e inmediatamente después se leyó la absorbancia a 414 nm. Las lecturas se realizaron cada 20 segundos en un lapso de 10 minutos (preparación de reactivos en el anexo VI). Una vez obtenidas las absorbancias se realizaron los cálculos necesarios para evaluar la actividad de acetilcolinesterasa, la cual está dada por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Acetilcolinesterasa} = \frac{\text{ABS} * \text{FDM} * \text{VT} (\mu\text{l})}{(\epsilon * d) * t (\text{min}) * \text{PROT} (\text{mg/ml}) * \text{FDP}} \quad (\text{Ec. 4})$$

[nmol/min-1/mg prot-1]

Donde:

**ABS**= absorbancia/min.

**PROT** = Concentración de proteína de la muestra (mg\*ml<sup>-1</sup>) medidas por el método de Bradford, 1976.

**FDP** = Factor de dilución utilizada en la proteína (en el caso de dilución).

**FDM** = Factor de dilución utilizada en el ensayo enzimático.

**VT** = Volumen total de la microcelda / Volumen de la muestra (225/25 = 9).

**t**= tiempo en minutos.

**ε** = 1.36x10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Coeficiente de extinción molar del ácido tionitrobenzoico).

**d**= diámetro de la microcelda (0.9 cm)

#### 6.2.2.2 *Recuento total de hemocitos*

Para la estandarización de esta técnica se realizaron recuentos de hemocitos en hemolinfa fijada con una solución de formalina al 4 % con NaCl 0.45 M (preparación en Anexo IV) durante diferentes horas y días para determinar el tiempo de desgranulación. De estas pruebas, se observó que los hemocitos se mantuvieron intactos a las 24 h, siempre y cuando se mantuvieran en frío desde el momento en que se toma la hemolinfa hasta su análisis.

El recuento total de hemocitos se determinó microscópicamente en una alícuota de 20 µl de muestra (por duplicado), por recuento directo usando una cámara de Neubauer y de acuerdo a la técnica descrita por Costa *et al.* (2009). Las lecturas se realizaron con el objetivo de 40x, tomando en cuenta los cuadros de las esquinas y el central, para garantizar que el recuento fuera aleatorio, con algunas consideraciones (Descripción detallada en anexo IV). Después, se calculó el total de células mediante la fórmula:

$$RTH = 5 \times (\sum \text{células}) \times 10^4 \times \text{factor dilución}$$

### 6.2.2.3 *Recuento diferencial de hemocitos*

El recuento diferencial consiste en estimar el porcentaje relativo de las tres diferentes poblaciones de hemocitos en la hemolinfa, como son los granulares, semigranulares y hialinos.

Las diferentes pruebas que se realizaron para el recuento diferencial de hemocitos fueron la identificación celular en hemolinfa y posteriormente pruebas de tinción de hemocitos. Para esto se realizaron frotis (dos por cada muestra). La tinción se realizó con eosina y hematoxilina (Sritunyalucksana *et al.*, 2005). En algunas muestras los hemocitos se sobre-tiñeron dificultándose la diferenciación celular.

Enseguida se probó la técnica de Costa *et al.* (2009), la cual consiste en fijar la hemolinfa con solución formalina (formalina al 4 % con NaCl 0.45 M). Posteriormente, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l de hemolinfa y mediante un microscopio de contraste de fases, se identificaron directamente en la cámara de Neubauer un total de 100 células. Las lecturas se realizaron por duplicado (ambos lados de la cámara) por lo cual 200 células se tomaron como el 100 % (Descripción detallada en el anexo IV). Se decidió utilizar esta técnica debido a que se obtenían resultados más rápidos y más seguros que con los frotis.

Para el conteo diferencial de hemocitos, en 20  $\mu$ l de hemolinfa fijada se cuentan 100 células (por ambos lados de la cámara) directamente en la cámara de Neubauer enfocando el microscopio en el ocular de 40x.

Posteriormente se toman las 200 células contadas como el 100% y se saca una relación en porcentaje, de los diferentes tipos de hemocitos (granulares, semigranulares y hialinos).

#### 6.2.2.4 *Actividad de Fenoloxidasa total (FO total), Fenoloxidasa (FO) y profenoloxidasa (proFO).*

La enzima profenoloxidasa (proFO) se convierte a fenoloxidasa (FO) mediante la enzima activadora de la profenoloxidasa (ppA) ante la presencia de algún patógeno u otros cuerpos extraños. De esta manera, se desencadena una cascada enzimática para obtener como producto final la melanina (Rodríguez y Le Moullac, 2000).

Las muestras de hemolinfa se procesaron para obtener el lisado de hemocitos de acuerdo al apartado 6.5 y 6.6. Posteriormente se tomó una alícuota para evaluar la actividad de FO, FO Total y proFO, así como las proteínas.

Para la estandarización de la actividad de estas enzimas (FO Total, FO, y proFO) inicialmente se siguió la técnica descrita por Hernández-López *et al.* (1996). Para la FO total, en una microplaca se adicionaron 50 µl del lisado de hemocitos, posteriormente se agregaron 50µl de tripsina y finalmente se añadieron otros 50 µl de L, 3,4- dihidroxifenilalanina (L-DOPA). La microplaca se dejó reposar durante 10 min e inmediatamente después se leyó la absorbancia a 490 nm. Para la FO se tomaron 50 µl de lisado de hemocitos y se añadieron 50 µl de L-DOPA, se dejó reposar durante 10 min y posteriormente se leyó la absorbancia a 490nm. Cada muestra se hizo por triplicado.

Para la evaluación de las muestras del bioensayo final se utilizó la técnica de Mexía- Salazar *et al.* (2008), con algunas modificaciones de la técnica de Hernández-López *et al.* (1996), para minimizar el volumen de lisado de hemocitos. Brevemente, para la actividad de FO, se colocaron 10 µl de

lisado de hemocitos en la microplaca por triplicado, se agregaron 250 µl de solución L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), y se incubaron durante 20 min a 25°C, posteriormente se lee la absorbancia a 490 nm. Para la actividad de FO Total, se tomaron 10 µl de lisado de hemocitos y se colocaron en microplaca por triplicado, se agregaron 10 µl de solución tripsina, se adicionaron 250 µl de solución L-DOPA y se incubaron durante 10 min a 25°C para posteriormente medir la absorbancia a 490 nm (preparación de reactivos en el anexo V). Una vez obtenidas las absorbancias, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la actividad específica (unidades FO/min/ mg prot), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Act. específica} = \frac{((\text{abs}) * (\text{FD}) / \text{TI (min)})}{\text{P (mg/ml)}} \quad (\text{Ec. 2})$$

FO y FO total (min/ mg prot)

Donde:

**Abs=** absorbancia de la muestra.

**FD=** factor de dilución, tomando en cuenta el anticoagulante y la hemolinfa obtenida, en este caso 2.

**TI=** tiempo de incubación, que fue de 10min ó 20 min.

**P=** concentración de proteínas de la muestra obtenidas mediante el método de Bradford.

La actividad de proFO, fue obtenida mediante la fórmula siguiente:

$$\text{proFO} = \text{FO Total} - \text{FO} \quad (\text{Ec. 3})$$

\*Los valores de actividad obtenidos para las actividades de FO y FO total se ajustaron a unidades, esto con la finalidad de que los valores fueran más manejables en términos de comparación. Una unidad de actividad de enzima es definida como un incremento en absorbancia de 0.001/min/ mg prot, por tal motivo el valor obtenido en la ecuación 2, se dividió entre 0.001.

#### 6.2.2.5 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa es una enzima importante para la defensa de las células contra las especies reactivas del oxígeno. La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno molecular ( $O_2$ ), los cuales se difunden fácilmente dentro de los espacios inter-membranas o la matriz mitocondrial (Muñoz *et al.*, 2000).

Se evaluó la actividad de SOD en el plasma, utilizando el Kit 19160 WST SOD Assay (SIGMA-ALDRICH). Este método es muy adecuado para determinar la SOD utilizando una sal de tetrazolio soluble en agua (TSA, 1(2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio, sal monosódica) que produce un compuesto formazan colorido soluble en agua por reducción con un anión superóxido.

El procedimiento consiste en colocar en la microplaca, por triplicado, el blanco uno (20  $\mu$ l de agua, 200  $\mu$ l de solución tetrazolio soluble en agua (TSA) y 20  $\mu$ l de solución enzima xantina oxidasa (XO)), el blanco dos (20  $\mu$ l de plasma, 200  $\mu$ l de solución TSA y 20  $\mu$ l de buffer de dilución) y el blanco tres (20  $\mu$ l de agua, 200  $\mu$ l de solución TSA y 20  $\mu$ l de buffer de dilución). Posteriormente se colocaron 20  $\mu$ l de plasma en cada celda de la microplaca (el plasma se obtuvo como se muestra en el apartado 6.6), luego se adicionaron 200  $\mu$ l de solución TSA y al final, se agregaron 20  $\mu$ l de solución de la enzima xantina oxidasa (XO). Inmediatamente después la muestra se incubó durante 40 min a 37°C leyó la absorbancia a 450 nm cada 2 min (preparación de reactivos en el anexo VII).

Para realizar los cálculos, se graficaron las  $\Delta A_{450nm}$  contra tiempo de reacción de cada muestra, así como también cada uno de los blancos (blanco 1, 2 y 3) y se indicó la línea de tendencia de cada uno.



Una vez obtenida la pendiente (que es la  $\Delta A_{450\text{nm}}/\text{min}$ ) se calculó el % de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{((S1 - S3) - (SS - S2)) \times 100}{(S1 - S3)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

S1= pendiente blanco1

S2= pendiente blanco2, cada muestra tiene su blanco2 correspondiente

S3= pendiente blanco3

SS= pendiente de la muestra

#### 6.2.2.6 *Peroxidación de Lípidos (LPO)*

La peroxidación lipídica frecuentemente ocurre como respuesta al estrés oxidativo y durante este proceso, se forman una gran diversidad de aldehídos. Algunos de ellos, como el malondialdehído (MDA) son altamente reactivos y pueden ser considerados como mensajeros tóxicos secundarios. Por tal motivo la medida del MDA es ampliamente usada como un indicador de peroxidación lipídica (Esterbauer *et al.*, 1991).

Para esta técnica se siguió la metodología descrita por Esterbauer *et al.*, (1991). Esta consiste en preparar una curva estándar con diferentes concentraciones que va de 0, 1, 2.5, 5 y 10  $\mu\text{M}$ . Posteriormente, para las muestras de plasma se colocaron en cada tubo 100  $\mu\text{l}$  de plasma, 325  $\mu\text{l}$  de solución MFI, y 75  $\mu\text{l}$  de HCl. **\*Nota: el HCl se adiciona al final, antes de incubar los tubos y se mezcla con vortex.**

Luego los tubos se incubaron a 45°C durante 40 min, posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 10 min en una centrífuga refrigerada. Finalmente, se tomaron 200 µl de cada tubo (muestra y estándar) y se colocaron en la microplaca, se leyó la absorbancia a 595 nm (Descripción detallada y preparación de reactivos en el anexo VIII).

Para la estandarización se probaron dos volúmenes de hemolinfa (100 y 200 µl) donde no se obtuvo una marcada variación en la respuesta, por lo que se decidió trabajar con 100 µl, con la finalidad de optimizar el volumen de hemolinfa para las demás pruebas.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se graficaron los valores de absorbancia de la curva contra concentración (µM) para obtener la pendiente mediante una regresión lineal.

Para calcular los niveles de MDA se utilizó la siguiente fórmula, tomando en cuenta: la pendiente de la recta, así como el promedio de absorbancia de cada una de las muestras:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Abs} * (\text{Vol. total} / \text{vol muestra})}{\text{Pendiente} * \text{muestra}} \text{ (Ec. 6)}$$

$\mu\text{mol/g}$   $\text{g/ml}$

Donde:

**Abs** = es el promedio de las absorbancias.

**Pendiente** = pendiente obtenida de la recta de la curva de calibración (abs/µmol)

**Volúmen total** = Volumen total contenido en el tubo Eppendorf (µl)

**Vol Muestra**= Volumen de muestra agregada al tubo (µl)

**Muestra (g/ml)**= peso húmedo de la muestra (g) entre el volumen total del tampón de homogeneización (ml).

Los resultados finales se expresan como nmol/ ml de hemolinfa

### 6.3 Bioensayos de letalidad

Para determinar la letalidad del Diazinón en juveniles de *L. vannamei* (12.24 g  $\pm$  1.05) se realizaron pruebas para encontrar el intervalo de toxicidad letal del Diazinón. Posteriormente, se calculó la dosis letal media (DL50: la dosis donde se obtuviera el 50% supervivencia de la población), y finalmente se calculó el intervalo de dosis subletales de Diazinón, en donde no se presenta mortalidad pero sí efectos del plaguicida en funciones vitales relacionados con el sistema inmunológico y antioxidante.

En general, para cada prueba de intervalo de toxicidad se preparó una solución madre a partir de DZN grado técnico con 95.9 % de ingrediente activo (i.a.) disuelto en una solución salina (PBS). Posteriormente, se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las diferentes dosis (ejemplo de preparación de solución madre y dosis en el anexo III).

Los organismos se aclimataron una semana previa a cada experimento con las condiciones descritas en el apartado 6.1.

#### 6.3.1 Pruebas de intervalo de toxicidad

En estas pruebas de intervalo de toxicidad, el objetivo fue establecer primero la mínima dosis del tóxico que ocasione la muerte del 100 % de los organismos durante las primeras 24 h, así mismo se procedió a encontrar la dosis más alta en la que no hay mortalidad durante el tiempo de exposición, para posteriormente determinar la DL50.

a) La primera prueba consistió en exponer a los organismos a cuatro diferentes dosis de Diazinón (1, 10, 100 y 1000  $\mu$ g de Diazinón/ g camarón) partiendo de una solución madre de 199  $\mu$ g de Diazinón/ ml y, además un

grupo control (expuesto a solución salina PBS). Se distribuyeron un total de diez organismos de *L. vannamei* se distribuyeron en cinco acuarios de plástico de 40 l aproximadamente (dos camarones por acuario) y se mantuvieron con las condiciones mencionadas en el apartado 6.1. Mediante la técnica de intubación se suministró a los organismos las diferentes dosis al inicio de la exposición, realizando observaciones a los 15, 30 y 45 min, y posteriormente a las 1, 2, 4, 8, 12, 24 h.

A los 15 min, los organismos expuestos a la dosis de 1000 µg de Diazinón/ g camarón nadaban en forma normal similar a los del control; sin embargo, los de la concentración de 100 µg de Diazinón/ g camarón nadaban rápidamente sin coordinación de movimientos. A los 45 min, los organismos de la dosis de 1000 µg de Diazinón/ g camarón empezaron con movimientos acelerados y después de 2 h 15 min los organismos ya no se movían al tacto por lo que fueron sacrificados.

Los organismos de la dosis de 100 µg de Diazinón/ g camarón, a los 30 minutos post exposición mostraron movimientos acelerados, a los 45 minutos presentaron nado errático, pleópodos con mucho movimiento y además, una coloración blanquecina. A la hora post exposición, uno de los organismos ya estaba moribundo sin reacción al tacto, por lo que se sacrificó; a las 2 h post exposición, se sacrificó el segundo organismo de esta misma dosis.

Los organismos del resto de las dosis (1, 10 µg de Diazinón/ g camarón), mantuvieron un comportamiento normal, similares a los del control, durante todas las observaciones, a las 24 h post exposición los organismos que sobrevivieron fueron sacrificados. De cada organismo se tomaron muestras de tejido ocular para los análisis de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. La razón por la cual se escogió este tejido se debe a que presenta mayor actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) (Cerón *et al.*, 1996; García de la Parra *et al.*, 2000).

Estos datos arrojaron una estimación aproximada de la dosis letal, sin embargo fue necesaria una segunda prueba para seguir acotando el intervalo de concentraciones y poder determinar la DL50.

b) Para la segunda prueba se tomó como base la dosis de 100  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón debido a que en el bioensayo anterior los efectos de comportamiento y mortalidad se observaron en dicha concentración. Se preparó una solución madre de 40247.31  $\mu\text{g}$  De Diazinón/ ml y después se prepararon concentraciones logarítmicas para lograr dosis en un intervalo de 5 a 100  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón (5, 9.1, 16.6, 30.17, 55 y 100  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón) y un control (con solución salina PBS).

Una semana previa al experimento, un total de 28 organismos se distribuyeron en 14 acuarios (dos acuarios por dosis con dos organismos cada uno), y se mantuvieron en las condiciones mencionadas en el apartado 6.1 durante las 72 h de duración de la prueba. Posteriormente, las diferentes dosis fueron administradas a los organismos mediante la técnica de intubación y las observaciones de éstos se realizaron a los 15, 30 y 45 min, y a las 1, 2, 4, 8, 12, 24 h post exposición.

En uno de los acuarios de la dosis más alta (100  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón), a los 30 min post exposición, los organismos empezaron a nadar muy rápido. A la hora post exposición, comenzaron a presentar espasmos, y saltos. Después de las dos horas post exposición, los organismos nadaron erráticamente y tenían movimientos acelerados. Cuando se cumplieron las cuatro horas, los organismos murieron y se tomaron inmediatamente muestras del ojo para evaluar la actividad de la acetilcolinesterasa.

En el otro acuario de la misma dosis (100  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón), a las dos horas post exposición, los organismos presentaron movimientos

acelerados, y saltos continuos. A las cuatro horas, un organismo estaba moribundo, con coloración blanquecina en el cuerpo y periópodos; el otro organismo presentó nado errático y movimientos un poco acelerados. Para las ocho horas post exposición, un organismo murió, y el otro continuó con nado errático, pero a las 48 h post exposición presentó movimientos acelerados. A las 72 h el organismo siguió vivo, a pesar de que su coloración era completamente blanca y se sacrificó con el resto de los organismos.

Los organismos sobrevivientes de las demás dosis (5, 9.1, 16.6, 30.17, y 55 µg de Diazinón/ g camarón), durante las primeras observaciones presentaron color marrón, pero probablemente fue debido al estrés. A las 72 h post exposición se sacrificaron tomándose muestras del ojo para la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y el resto del organismo se guardó a 4°C hasta el momento de realizar los análisis de cromatografía de gases, para comprobar la presencia del plaguicida en el organismo.

#### c) Determinación de la dosis letal media (DL50)

Con base en la prueba anterior donde se presentó mortalidad en la dosis de 100 µg de Diazinón/g camarón se planteó la prueba de letalidad para determinar la DL50. Para esto se seleccionaron siete dosis logarítmicas en el intervalo de 0.1 a 50 µg de Diazinón/ g camarón: 0.1, 8.4, 16.7, 25.1, 33.4, 41.7 y 50 µg de Diazinón/ g camarón y un control (con solución salina PBS).

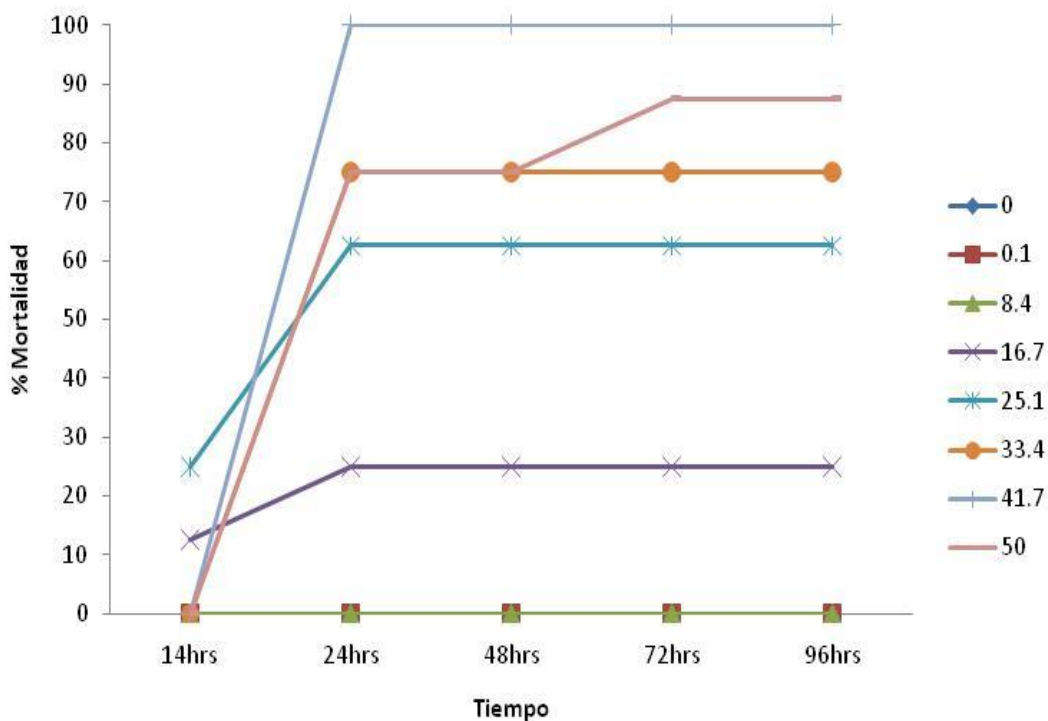
Durante este bioensayo se utilizaron ocho jvas de 72 l (una jva por concentración), donde se distribuyeron un total de 64 organismos (ocho por dosis), los cuales se mantuvieron en las condiciones descritas en el apartado 6.1 durante las 96 h de exposición. Las diferentes dosis se suministraron a los organismos una sola vez y posteriormente se realizaron observaciones cada 24 h.

A las 24 h post exposición, se registraron mortalidades casi del 100 %, en la dosis de 50 µg de Diazinón/ g camarón (tres organismos muertos y tres moribundos, sin reacción al tacto) y en la dosis de 41.7 µg de Diazinón/ g camarón (siete organismos muertos, y uno moribundo, sin reacción al tacto). En las dosis de 33.4, 25.1 y 16.7 µg de Diazinón/ g camarón se registraron mortalidades del 75 % (seis organismos muertos), 50 % (un organismo muerto y cuatro moribundos) y 25 % (un organismo muerto y un moribundo), respectivamente. De los organismos que se encontraron moribundos (nueve organismos) al momento en que se realizaron las observaciones, se tomó muestra de ojo y músculo, y el resto del organismo se guardó para el análisis por cromatografía de gases.

A las 48 h post exposición no se registraron mortalidades en ninguna de las dosis. Pero a las 72 h post exposición se encontró un organismo muerto en la dosis de 50 µg de Diazinón/ g camarón. Para las 96 h post exposición no se registraron mortalidades.

Los organismos que sobrevivieron hasta las 96 h (37 organismos), fueron sacrificados tomándose muestras de ojo y músculo para evaluar la acetilcolinesterasa y el resto del organismo se guardó a -80°C hasta su análisis por cromatografía de gases.

En los datos de mortalidad obtenidos durante la tercera prueba de toxicidad (Fig. 10) se puede observar que exceptuando la dosis de 41.7 µg de Diazinón/ g camarón donde se presentó mayor mortalidad, en general, la mortalidad aumenta conforme aumenta la dosis.



**Figura 10.** Porcentaje de mortalidad de la tercera prueba de letalidad con Diazinón.

#### 6.4 Toxicidad subletal

Una vez obtenida la DL50, y la estandarización de cada una de las técnicas a utilizar, se procedió a definir el diseño de un experimento para exponer a los organismos a dosis subletales durante 72 h, con la finalidad de poder medir las respuestas biológicas resultado de la exposición al plaguicida.

La aclimatación de los organismos fue cuatro días previos al bioensayo final, con las mismas condiciones descritas anteriormente en el apartado 6.1. Se seleccionaron 189 organismos del lote de organismos con un peso promedio de  $12.24 \text{ g} \pm 1.05$  y se distribuyeron aleatoriamente en nueve jivas previamente forradas con plástico blanco y con tapas de tela (tul), para poder observar mejor a los organismos. Durante la aclimatación y todo el tiempo del experimento (72



h) el agua se mantuvo a flujo continuo, y los organismos se alimentaron dos veces al día con una ración correspondiente al 2 % de su biomasa con alimento comercial API- CAMARON (Malta Cleyton, 40% de proteína).

Para el experimento de exposición se preparó una solución madre con una concentración nominal de 11155.09 µg de Diazinón (grado técnico 95.9 % i. a.) por ml de solución salina (PBS). Con esta solución madre se realizaron las diluciones correspondientes con PBS para obtener las dosis experimentales de 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g de camarón (preparación de solución madre y diluciones en el anexo III), y se incluyó un control para cada tiempo de muestreo (6, 24 y 72 h). Se utilizaron nueve jivas (dos para cada tratamiento y tres para el control) y dentro de cada java se colocaron 21 organismos, para dar un total de 189.

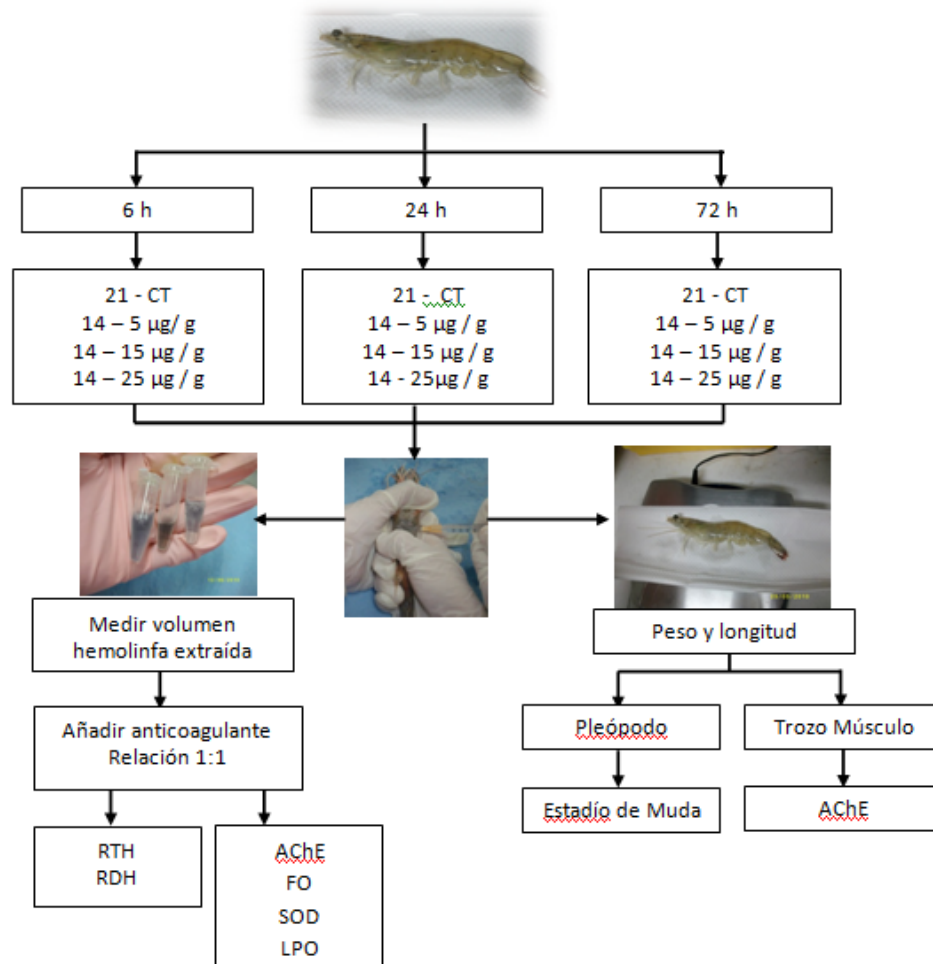
Los organismos fueron intoxicados mediante la técnica de intubación al inicio del bioensayo con las diferentes dosis de Diazinón y con PBS en el caso de los controles. Los muestreos se realizaron a las 6, 24 y 72 h post exposición, colectando por cada tiempo de muestreo 21 organismos del control y 14 organismos por dosis (63 organismos en total por cada tiempo de muestreo). Cada organismo fue tomado como réplica, dado que cada respuesta fue evaluada individualmente.

## **6.5 Obtención de muestras**

Las muestras de hemolinfa se obtuvieron del seno ventral de la base del primer segmento abdominal, usando una jeringa de tuberculina previamente cargada con 200 µl de solución de anticoagulante SIC- EDTA 2X fría (preparación en anexo I). Posteriormente, la hemolinfa fue medida con una micropipeta para registrar la cantidad extraída del organismo, y con base a la

cantidad total obtenida, se le agregó solución anticoagulante hasta obtener una relación 1:1.

Una vez colectada la hemolinfa se distribuyó en diferentes alícuotas para la evaluación de todas las respuestas (ver apartado 6.6). Posteriormente, el organismo fue pesado y medido, después de esto se tomó un pleópodo para determinar el estadio de muda y una parte de músculo para evaluar la actividad de acetilcolinesterasa. Ambas muestras fueron colectadas en tubos eppendorf previamente etiquetados y se mantuvieron a 4°C y -80°C, respectivamente hasta su análisis (Fig. 10).

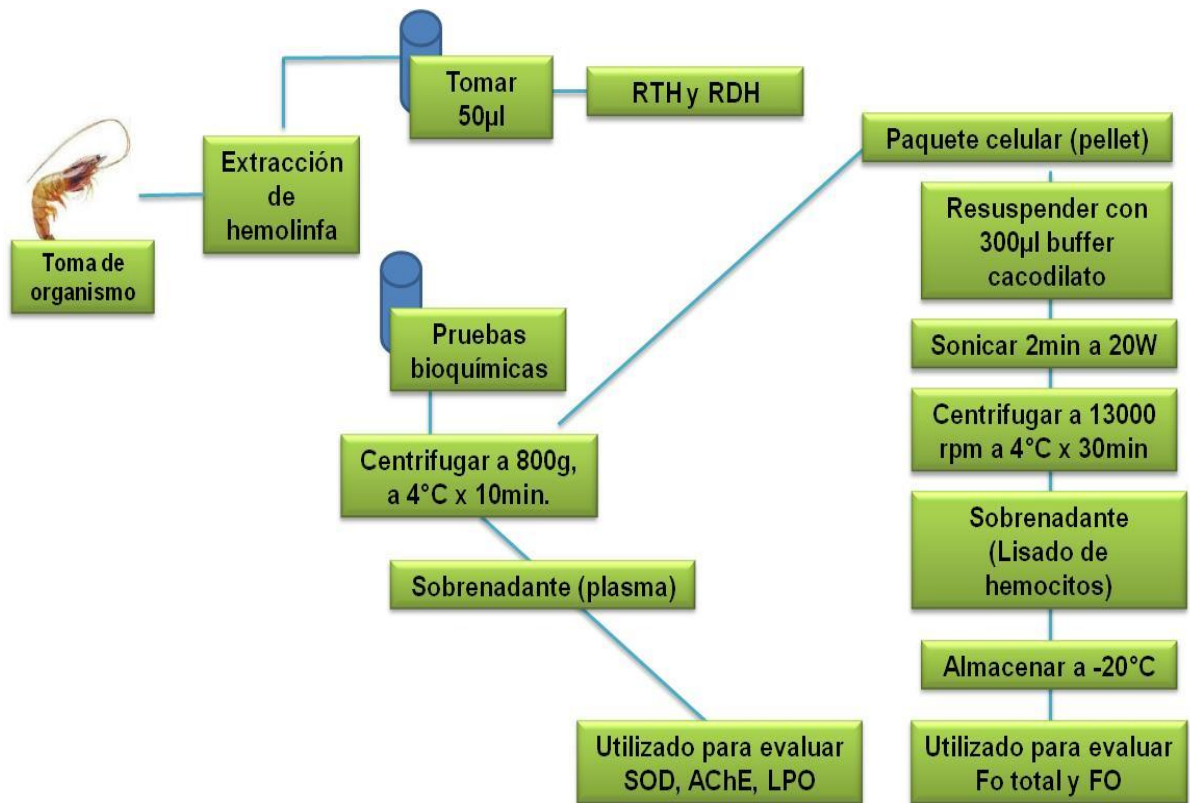


**Figura 11.** Obtención de muestras de hemolinfa, músculo, pleópodo y conservación del resto del organismo para evaluar las diferentes pruebas.

## 6.6 Procesamiento de muestras

Después de colectar la hemolinfa, ésta se dividió en dos alícuotas, una para el recuento de hemocitos (total y diferencial) y la otra para el resto de las pruebas bioquímicas. Para el recuento de hemocitos (total (RTH) y diferencial (RDH)) se tomó una alícuota de 50 µl que se mezclaron con 50 µl de formalina al 4 %. El recuento de hemocitos se realizó inmediatamente después de fijar la muestra con la formalina mediante las técnicas descritas por Costa *et al.* (2009) y Pan *et al.* (2008), respectivamente, tal como se menciona en el apartado 6.2.2 y 6.5.

El resto de la hemolinfa fue utilizada para las pruebas enzimáticas y LPO. Para lo cual, la hemolinfa se centrifugó a 800 g a 4°C durante 10 min. Luego, se retiró el sobrenadante, mismo que se utilizó para las pruebas bioquímicas y se almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis. El paquete celular (pellet) se resuspendió con 300 µl de buffer cacodilato y posteriormente se sonicó a 20 W durante 2 min para lisar los hemocitos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C durante 30 min y finalmente se obtuvo el sobrenadante del lisado de hemocitos. Las muestras se almacenaron a -20°C, hasta el momento de ser utilizadas (Fig. 11).



**Figura 12.** Procedimiento para la obtención de muestras.

Las muestras de plasma y lisado de hemocitos fueron retiradas del congelador en lotes de 25 y se conservaron en una hielera (4°C). Una vez descongeladas, se procedió a realizar cada una de las técnicas (descritas a detalle en el apartado 6.2.2), tomándose alícuotas para evaluar la activación del sistema profenoloxidasas (FO total, FO y proPO) mediante la técnica descrita por Mexía-Salazar *et al.* (2008). La actividad de acetilcolinesterasa se evaluó siguiendo el método de Ellman *et al.* (1961), adaptado a microplaca por Guillhermino *et al.* (1991). La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) según el procedimiento de MCord y Fridovich (1969), utilizando el Kit comercial para ensayo SOD WST de Sigma. Las proteínas totales cuantificadas mediante el método de Bradford (1976). Así mismo, se evaluó el estrés oxidativo mediante la determinación del contenido de malondialdehído (MDA),

siguiendo la técnica de Esterbauer *et al.* (1991). Las actividades enzimáticas se realizaron directamente en el plasma o lisado de hemocitos, mientras que para determinar la concentración de proteínas para las actividades enzimáticas AChE y SOD se utilizó una dilución 1:100 y para evaluar la concentración de proteínas del lisado de hemocitos se utilizó una dilución 1:50.

Las muestras de músculo fueron retiradas del ultracongelador y descongeladas en lotes de 15; dichas muestras se conservaron en una hielera (4°C). Una vez descongeladas, las muestras fueron pesadas en una balanza electrónica, para posteriormente homogenizarse con el tampón de homogenización TRIS- HCl 0.1 M pH 7.2 en una proporción 1:5 (p/v) (preparación en el anexo II). Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 10,000 g a 4°C durante 10 minutos, para posteriormente obtener el sobrenadante, el cual se separó cuidadosamente con pipetas Pasteur de plástico para no mezclar la capa sólida formada en el fondo. El sobrenadante obtenido se utilizó únicamente para evaluar la actividad de AChE como se explica en el apartado 6.2.2

Para determinar el estadio de muda, se colocó en un portaobjetos una pequeña gota de PBS, posteriormente, con ayuda de una pinza, se tomaron los pleópodos disectados, se colocó uno por portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. El portaobjetos se colocó en un microscopio para ser observado en el ocular de 100x y se determinó el estadio de muda con base a lo descrito por Chang *et al.*, 1988.

## **6.7 Análisis Cromatográficos**

La solución madre y las diluciones utilizadas para el bioensayo final fueron analizadas por cromatografía de gases para verificar las dosis de Diazinón.

Se realizó una extracción líquido- líquido de las muestras con base al método EPA (2007), para lo cual se tomó 1 ml de solución de prueba y se mezclaron con 9 ml de agua destilada, posteriormente se agregó 1 g de NaCl. Luego, se agregaron 5 ml de diclorometano (3 veces), la muestra se agitó de manera automática durante 10 minutos, y posteriormente se dejó en reposo por 5 minutos aproximadamente, este procedimiento fue para lograr una mejor extracción.

Luego con ayuda de una suave corriente de Nitrógeno se evapora el solvente y la muestra se resuspende en 1 ml de hexano. Una vez obtenida la muestra se colocó en un vial para posteriormente ser inyectado en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 equipado con un detector nitrógeno-fósforo (NPD) e inyector automático 7683. La separación de las muestras fue llevada a cabo en una columna HP5 (30m x 0.25mmID x 0.25µm film) marca J&W Scientific con las siguientes condiciones de operación: la temperatura del horno a 110°C aumentó a 255°C (20°C/ min), y se calentó por cinco minutos. Posteriormente aumentó a 300°C (20°C/ min) y se calentó por cinco minutos. Las temperaturas de inyección modo “splitless” y del detector NPD fueron de 280°C y 290°C, respectivamente. El nitrógeno fue usado como gas acarreador y gas del detector, con un flujo de 22.4 ml/ min y presión de 9.38 psi para el gas acarreador y un flujo de 4 ml/ min como gas del detector.

## **6.8 Análisis estadístico**

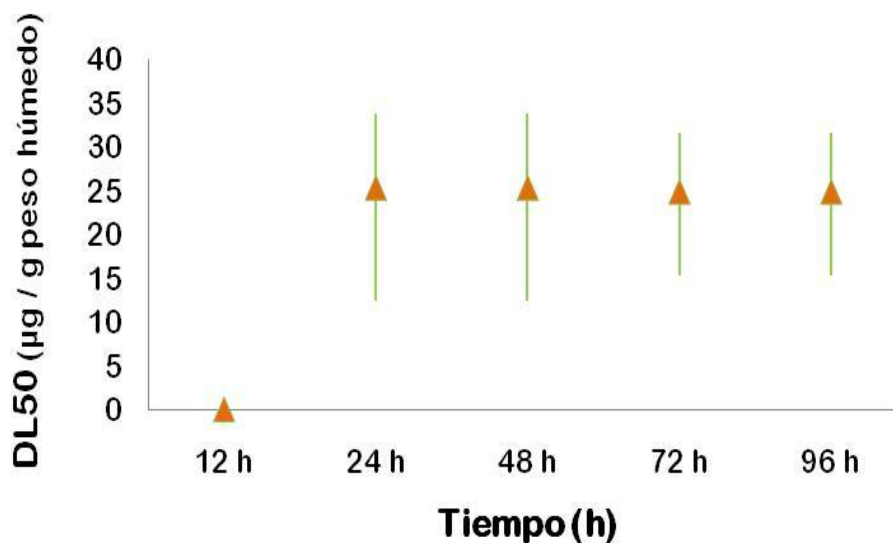
Todos los datos obtenidos en las diferentes pruebas fueron analizados usando el programa SIGMA PLOT 11.0 con una confianza del 5 %. En todos los casos se analizó la homogeneidad, varianza y normalidad de los datos. En aquellos casos, donde los datos no pasaron dichas pruebas, fueron transformados con raíz cuadrada.

Para el análisis de cada una de las pruebas enzimáticas (FO Total, FO, AChE, SOD, LPO), así como el recuento total y diferencial de hemocitos, se aplicó un ANDEVA de dos vías acoplado a una prueba de comparación pareada Holm- Sidak tomando como factores la dosis (5, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón) y el tiempo (6, 24 y 72 h).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Dosis Letal media (DL50)

Los resultados de mortalidad obtenidos en la tercera prueba de letalidad (ver Fig. 10) fueron utilizados posteriormente para determinar la dosis letal media (DL50) mediante el programa Toxys. Los resultados indicaron que para las 24 y 48 h la DL50 fue de 25.310 con sus respectivos límites 33.80 y 12.47; y para las 72 y 96 h la DL50 fue de 24.90 (31.62, 15.31, respectivamente) (Fig. 13). Como se puede observar no existe mucha variación en la DL50 obtenida en los diferentes tiempos.



**Figura 13.** Dosis letal media (DL50) de Diazinón a 24, 48, 72 y 96 h en *L. vannamei*.

### 7.2 Cromatografía de gases de las soluciones de prueba

Los resultados de los análisis cromatográficos de las dosis de prueba utilizadas en la prueba de toxicidad subletal de Diazinón se presentan en las



Tablas 6 y 7. Claramente se observa que los valores obtenidos en la concentración nominal y la concentración real después de realizar los análisis son muy similares por lo cual se decidió utilizar la concentración nominal para reportar el resto de los datos obtenidos.

**Tabla 6.** Concentración nominal y real de la solución madre

<b>Concentración nominal</b>	<b>Concentración real</b>
1225.00	1651.8955
3675.00	3836.3762
6125.00	6445.0762

**Tabla 7.** Dosis nominal y real de Diazinón

<b>Dosis nominal</b>	<b>Dosis real</b>
5	6.74
15	15.66
25	26.31

### 7.3 Estadio de muda

El ciclo de muda es una fuente interna de variaciones que afectan numerosas funciones fisiológicas en los crustáceos, afectando a su vez las defensas celulares, permitiendo a los patógenos penetrar más fácilmente dentro del cuerpo a través de la nueva cutícula (Le Moullac *et al.*, 1997). En el presente estudio se analizaron las muestras de pleópodo con ayuda de un microscopio para determinar el estadio de muda de cada organismo donde los datos obtenidos por cada tratamiento y cada tiempo de muestreo se muestran a continuación:

**Tabla 8.** Porcentajes de estadio de muda de *L. vannamei* a 6 h en cada tratamiento

<b>Estadio</b>	<b>Control</b>	<b>5 µg/ g</b>	<b>15 µg/ g</b>	<b>25 µg/ g</b>	<b>Total</b>
<b>A</b>	0	0	0	0	0
<b>B</b>	0	0	8.3 %	0	1.6 %
<b>C1</b>	0	7.1 %	0	0	1.6 %
<b>C2</b>	0	0	0	0	0
<b>C3</b>	0	14.3 %	25.0 %	14.3 %	11.5 %
<b>D0</b>	28.6 %	21.4 %	33.3 %	35.7 %	29.5 %
<b>D1</b>	47.6 %	50 %	33.3 %	50.0 %	45.9 %
<b>D2</b>	4.8 %	7.1 %	0	0	3.3 %
<b>D3</b>	19.0 %	0	0	0	6.6 %

**Tabla 9.** Porcentajes de estadio de muda de *L. vannamei* a 24 h en cada tratamiento

<b>Estadio</b>	<b>Control</b>	<b>5 µg/ g</b>	<b>15 µg/ g</b>	<b>25 µg/ g</b>	<b>Total</b>
<b>A</b>	0	0	0	7.1 %	1.5 %
<b>B</b>	0	7.1 %	0	0	1.5 %
<b>C1</b>	4.0 %	0	0	7.1 %	3.0 %
<b>C2</b>	12.0 %	0	7.7 %	7.1 %	7.6 %
<b>C3</b>	16.0 %	7.1 %	15.4 %	0	10.6 %
<b>D0</b>	20.0 %	35.7 %	15.4 %	35.7 %	25.8 %
<b>D1</b>	28.0 %	21.4 %	30.8 %	21.4 %	25.8 %
<b>D2</b>	16.0 %	21.4 %	23.1 %	21.4 %	19.5 %
<b>D3</b>	4.0 %	7.1 %	7.7 %	0	4.5 %

**Tabla 10.** Porcentajes de estadio de muda de *L. vannamei* a 72 h en cada tratamiento

Estadio	Control	5 µg/ g	15 µg/ g	25 µg/ g	Total
A	0	0	7.7 %	0	1.8 %
B	0	0	0	10.0 %	1.8 %
C1	14.3 %	25.0 %	7.7 %	20.0 %	16.1 %
C2	0	0	0	10.0 %	1.8 %
C3	14.3 %	8.3 %	15.4 %	10.0 %	12.5 %
D0	9.5 %	25.0 %	23.1 %	20.0 %	17.9 %
D1	14.3 %	8.3 %	0 %	0	7.1 %
D2	42.9 %	33.3 %	38.5 %	20.0 %	35.7 %
D3	4.8 %	0	7.7 %	10.0 %	5.4 %

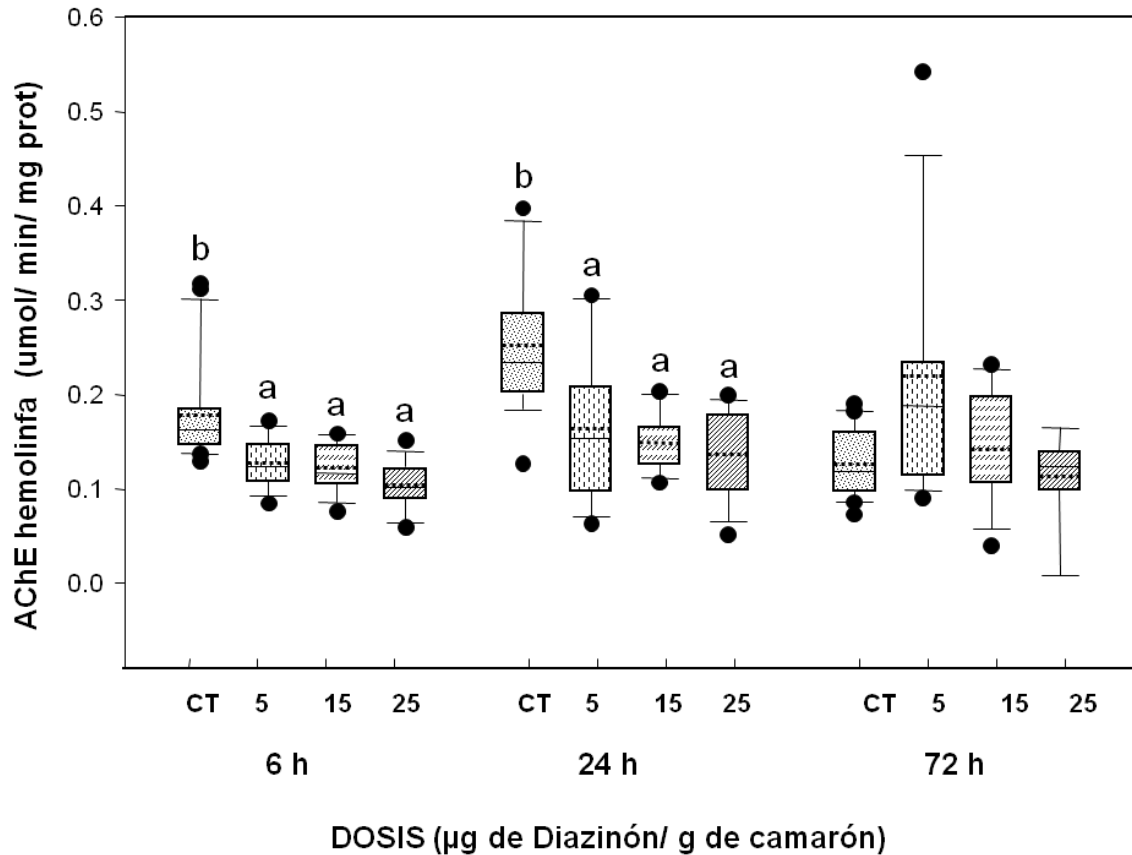
#### 7.4 Actividad de Acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima esencial para la transmisión de los impulsos nerviosos. La inhibición de esta enzima es ampliamente usada como biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos, tanto en vertebrados como en invertebrados (Frasco *et al.*, 2006).

En el presente estudio, la evaluación de la actividad de acetilcolinesterasa se realizó en hemolinfa y músculo del camarón *L. vannamei* expuesto a diferentes dosis de Diazinón (5, 15, y 25 µg de Diazinón/ g camarón) a diferentes tiempos (6, 24, y 72 h).

La actividad de acetilcolinesterasa en hemolinfa en los tratamientos disminuyó de manera dependiente de la dosis de Diazinón aplicada a las 6 y 24 h post exposición (de CT a 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6 h: 0.18, 0.13, 0.12, 0.10 y a 24 h: 0.25, 0.16, 0.15, 0.14 nmol/ min/ mg prot) presentándose diferencias significativas entre los tratamientos y el control ( $p < 0.002$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). A las 72 h post exposición, se observó que la actividad aumentó a valores similares a los del control, lo que indica que los organismos

se empezaron a recuperar en todos los tratamientos (de CT a 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón: 0.1266, 0.2193, 0.1460, 0.1136 nmol/ min/ mg prot), no presentándose diferencias estadísticas en este tiempo ( $p > 0.06$ ) (Fig. 14).



**Figura 14.** Actividad de acetilcolinesterasa (AChE) en hemolinfa de *L. vannamei* expuesto a 5, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre dosis por cada tiempo ( $p \leq 0.05$ ) CT= control.

La inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por exposición a plaguicidas organofosforados ha sido ampliamente documentada en mamíferos y peces, mientras que la información en crustáceos, especialmente el camarón, es escasa. No obstante, los resultados obtenidos en el presente estudio a las 6 y 24 h concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores quienes han encontrado una relación dosis-respuesta por exposición a plaguicidas por

ejemplo en el pez *Oreochromis niloticus* expuesto a Diazinón (Durmaz *et al.*, 2006), y en invertebrados como *L. vannamei* expuesto a metamidofos (García de la Parra *et al.*, 2006), y *M. edullis* expuesto a clorfenvinfos (Rickwood y Galloway, 2004).

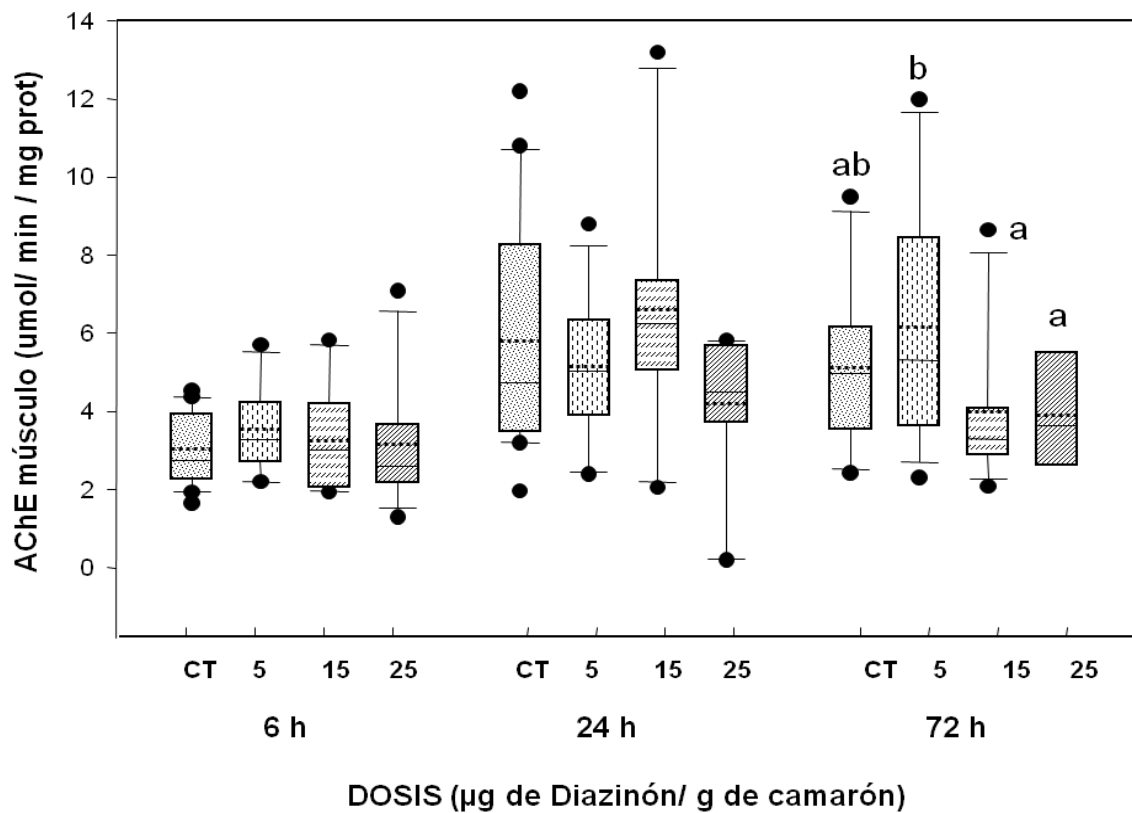
Key *et al.*, (1998a) reportaron que a las 6 h post exposición hubo una disminución en la actividad de AChE conforme aumentó la concentración de Azinfosmetil en larvas del camarón *Palaemonetes pugio*; pero a su vez, en el día 15 post exposición, obtuvieron valores de actividad similares a los del grupo control. Esta probable inhibición en etapas iniciales puede deberse a que la constante exposición a organofosforados puede afectar el sitio de síntesis de AChE y disminuir los niveles de AChE (Uner *et al.*, 2006). Sin embargo, la inhibición de acetilcolinesterasa es una función de la toma, la acumulación y el metabolismo de organofosforados (Key *et al.*, 1998b); ya que el efecto de inhibición depende de la capacidad del organismos para hidrolizar la enzima inhibida ó sintetizarla de nuevo (Key *et al.*, 2003), además de la capacidad para metabolizar y/o eliminar el plaguicida (Hyne y Maher, 2003).

Wu *et al.*, 2005, mencionan que en varias respuestas biológicas, como la acetilcolinesterasa se observa una inducción - recuperación lo cual refleja una exposición reciente, como lo que se observó en este estudio al presentarse una rápida y máxima inducción a etapas iniciales de exposición y una adaptación de los organismos a las 72 h. Esta recuperación de la actividad de AChE probablemente se deba a que los porcentajes de inhibición fueron menores a 30 % manteniéndose dentro del intervalo de efectos reversibles, y además de que el tiempo exposición al tóxico fue una sola vez.

En contraste con los resultados de AChE en hemolinfa, en la actividad de AChE en músculo se observó que a las 6 h post exposición, únicamente se presentó una disminución de actividad de AChE en la dosis de 25 µg de Diazinón/ g camarón (3.1453 nmol/ min/ mg prot con % de inhibición), a pesar

de que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.108$ ) (Fig. 15).

En las muestras obtenidas a las 24 h post exposición, en la dosis de 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón se observó la mínima actividad de AChE (4.2062 nmol/ min/ mg prot con % de inhibición), pero sin diferencias estadísticas respecto al control y los tratamientos ( $p \geq 0.05$ ). A las 72 h post exposición, se observó una baja actividad de AChE en las dosis de 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón (3.98 y 3.89 nmol/ min/ mg prot respectivamente) con diferencias significativas respecto a la dosis de 5  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón ( $p < 0.002$ ).



**Figura 15.** Actividad de acetilcolinesterasa en músculo de *L. vannamei* expuesto a 5, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre dosis ( $p \leq 0.05$ ) CT= control

Los resultados obtenidos en la actividad de acetilcolinesterasa en músculo demuestran que la respuesta es más tardía en músculo que en hemolinfa, ya que los efectos se presentaron hasta las 72 h en las dosis más altas. Sin embargo, comparando las actividades de músculo y hemolinfa, se observa que los valores de AChE obtenidos en músculo son más altos que los obtenidos en hemolinfa. Esto probablemente se deba a que el tóxico se administró mediante intubación, actuando primeramente en la hemolinfa, donde la respuesta fue rápida y más sensible.

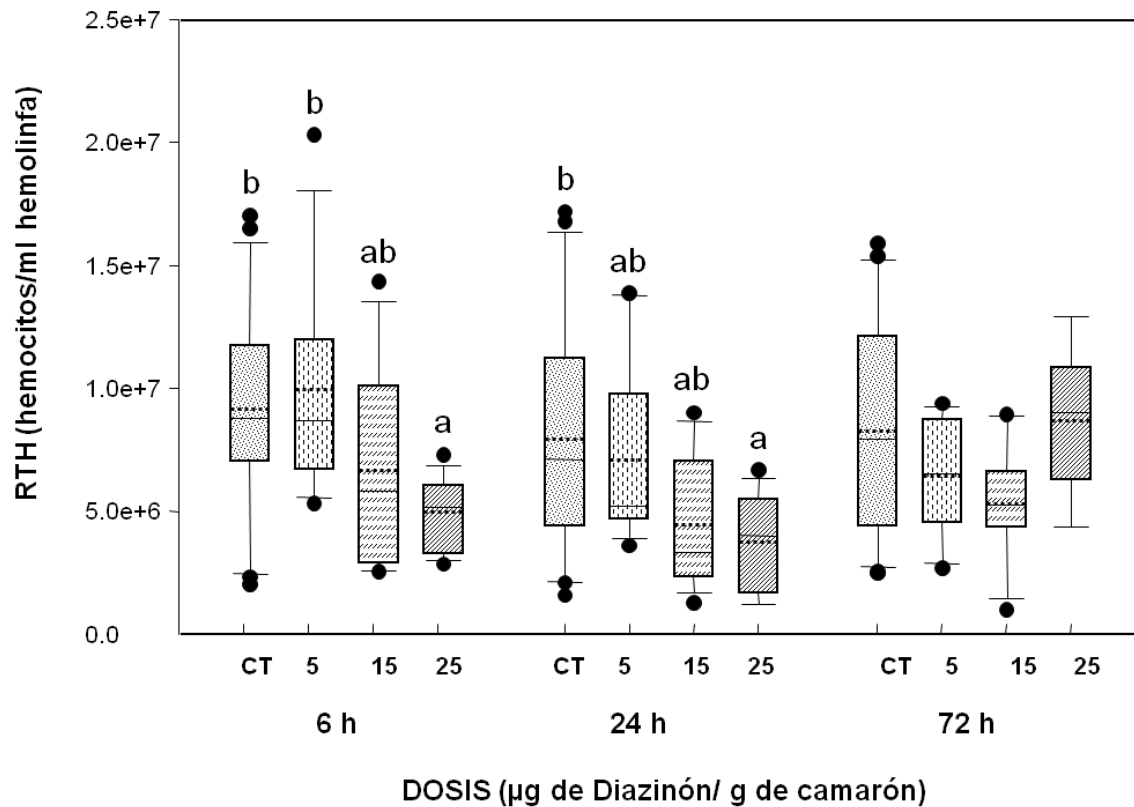
Aunque hay poca evidencia de la inmutoxicidad de plaguicidas organofosforados en invertebrados, Yang *et al.*, (1996) al exponer a ratas al organofosforado diisopropilfosforofluoridato (DPF) encontraron la inhibición de la actividad de AChE y un aumento de LPO, sugiriendo que la hiperactividad colinérgica producida por el plaguicida inicia la acumulación de radicales libres dando LPO, lo cual puede ser un iniciador de la lesión celular inducida por el plaguicida.

## 7.5 Recuento Total de Hemocitos (RTH)

Debido a la importancia que tienen los hemocitos en la defensa inmunológica del camarón al liberar y desencadenar las respuestas humorales y celulares, el número de hemocitos circulantes en la hemolinfa se ha utilizado como un indicador del estado de salud del organismo (Yeh *et al.*, 2009). El recuento total de hemocitos (RTH) en muestras de hemolinfa de juveniles de *L. vannamei* expuestos a diferentes dosis de Diazinón y a diferentes tiempos de exposición se muestra en la Fig. 16.

De manera general, se observa que en los grupos control a los tres tiempos se comportaron de manera similar, por lo tanto, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.162$ ). Con respecto a los tratamientos, a

las 6 y 24 h existe una disminución en el recuento de hemocitos conforme aumenta la dosis (CT a 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón a 6 h:  $9.16 \times 10^6$ ,  $9.97 \times 10^6$ ,  $6.67 \times 10^6$ ,  $4.97 \times 10^6$  hemocitos/ ml hemolinfa; a 24 h:  $7.94 \times 10^6$ ,  $7.11 \times 10^6$ ,  $4.46 \times 10^6$ ,  $3.73 \times 10^6$  hemocitos/ ml hemolinfa; respectivamente). Así mismo, se observó una disminución en RTH de los camarones expuestos a la dosis más alta (25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón), con diferencias significativas respecto al control ( $p= 0.002$  para 6 y 24h). En cambio, a las 72 h post-exposición no se presentaron diferencias significativas entre ningún tratamiento ( $p > 0.05$ ).



**Figura 16.** Recuento total de hemocitos (RTH) de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre dosis por cada tiempo ( $p \leq 0.05$ ). CT= control.



En este estudio la presencia del Diazinón afectó el recuento total de hemocitos en las dosis de 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a las 6 y 24 h post exposición, mientras que a las 72 h los organismos aparentemente comienzan una fase de compensación. A pesar de que algunos autores han reportado el efecto de los plaguicidas en el camarón, se desconoce el mecanismo exacto por el cual éstos activan el sistema inmunológico (Bhavan y Geraldine, 2001; Comoglio *et al.*, 2005; Frasco *et al.*, 2006; Key y Fulton, 2006). Sin embargo se conoce que el organismo al sentirse amenazado, puede movilizar los hemocitos de los reservorios del seno hemal hacia la hemolinfa para restablecer los valores y/o sobrerregular la división celular para provocar la maduración y proliferación de hemocitos precursores en el tejido hematopoyético (Lorenzon *et al.*, 2001), el cual continuamente está reemplazando nuevos hemocitos en la hemolinfa para que el organismo pueda protegerse del agente extraño (Van de Braak *et al.*, 2002). Así mismo es probable suponer que los plaguicidas indirectamente provocan disminuciones en el total de hemocitos circulantes al afectar otras vías bioquímicas como las CYP450, la síntesis de quitina o la inhibición de AChE (Días-Baimy, 2000).

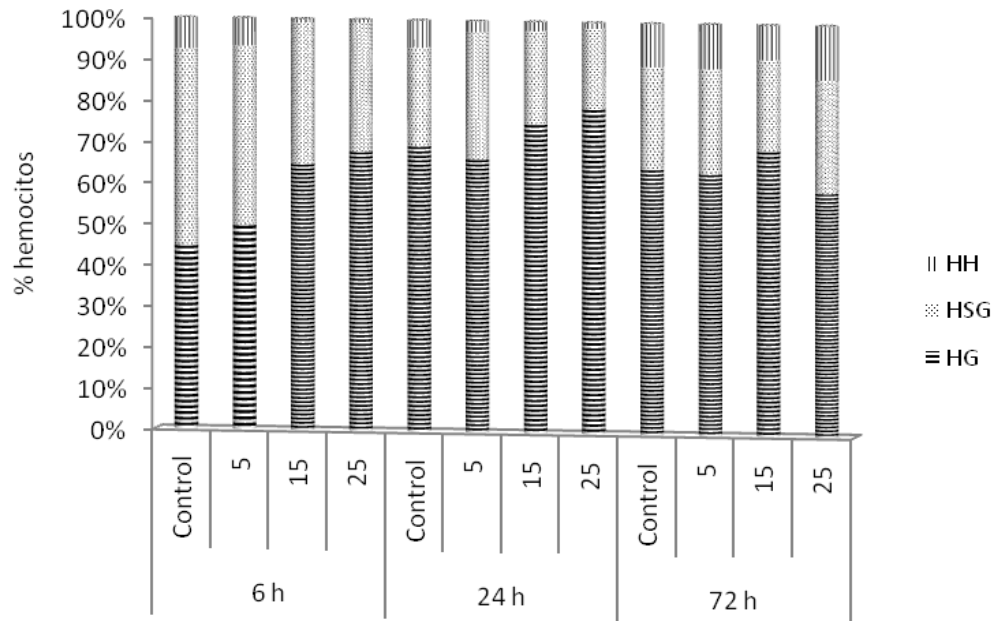
Disminuciones en el recuento de hemocitos han sido observados por Rickwood y Galloway (2004) en el mejillón *Mytilus edulis* al exponerlo a un plaguicida organofosforado (Clorfenvinfos), siendo más significativa la disminución en la concentración más alta (0.03 mg/ l) después de 24 h de exposición; ellos atribuyen este efecto a que el Clorfenvinfos inhibe las serinas hidrolasas, las cuales están presentes en los caminos de transducción de señales que modulan la activación, la proliferación y, subsecuentemente, las funciones vitales inmunológicas. Por otro lado, Mexía-Salazar *et al.* (2008) también encontraron una reducción en el número de hemocitos de *L. vannamei* expuesto a diferentes concentraciones de Fumosina, una toxina producida por hongos. La disminución de hemocitos causada por esta toxina, provocó una disminución de la respuesta inmune del camarón, y consecutivamente daños histológicos en el hepatopáncreas.

Otros autores han observado disminuciones en el número de hemocitos cuando los camarones han sido expuestos a bacterias o virus y/o sometidos a otro tipo de estrés como salinidad, temperatura o estimulantes (Ji *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Sarathi *et al.*, 2007). Chang *et al.* (2006) no observaron disminución de hemocitos cuando expusieron al camarón de agua dulce (*M. rosenbergii*) al plaguicida organofosforado Triclorfon a 0.2 y 0.4 mg / l. Tampoco Mercier *et al.* (2006), observaron diferencias significativas en el recuento total de hemocitos cuando *L. vannamei* fue expuesto a estrés por manipulación, atribuyendo que esto pudo ocurrir como una respuesta adaptativa del camarón.

En el camarón, los hemocitos se clasifican con base a su morfología y citoquímica, en tres grupos: hemocitos hialinos (sin gránulos), semigranulares (con pequeños gránulos) y granulares (grandes gránulos). Ellos tienen un papel fundamental en las reacciones de defensa, debido a que se movilizan y desencadenan una serie de reacciones para eliminar microorganismos o cualquier agente extraño (Bachere, 2000; Soderhall *et al.*, 2003).

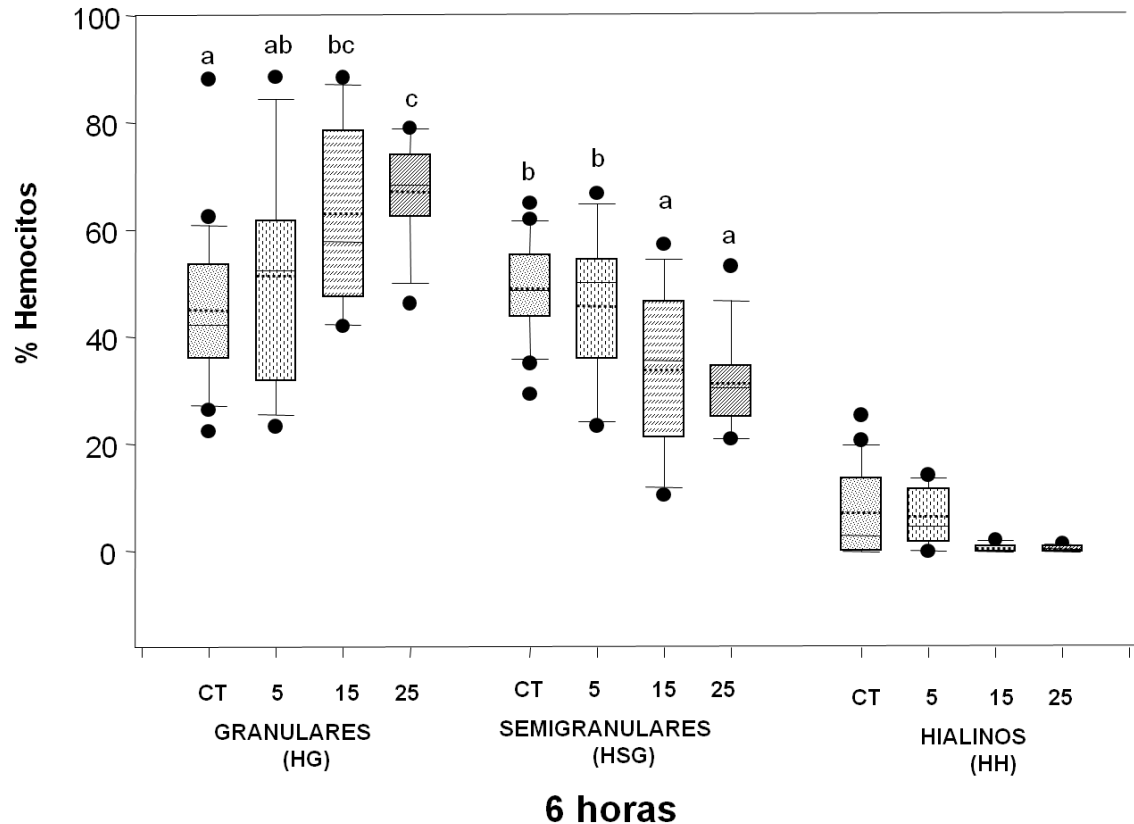
En el presente estudio se evaluó el recuento diferencial de hemocitos (RDH) en *L. vannamei* expuestos a tres diferentes dosis de Diazinón a diferentes tiempos (6, 24, y 72 h). Los resultados se expresaron en porcentaje de cada tipo de hemocitos respecto a un total de 200 células consideradas como el 100%.

En general durante los tres periodos de exposición se observó un mayor porcentaje de hemocitos granulares (HG), seguidos por hemocitos semigranulares (HSG) y en menor proporción los hemocitos hialinos (HH). Cabe señalar que a las 6 y 24 h post exposición las tendencias de los hemocitos granulares y semigranulares son inversas con respecto a la concentración (Fig. 17).



**Figura 17.** Recuento diferencial de hemocitos de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). CT= control, HH= Hemocitos hialinos, HSG= Hemocitos semigranulares y HG= Hemocitos granulares.

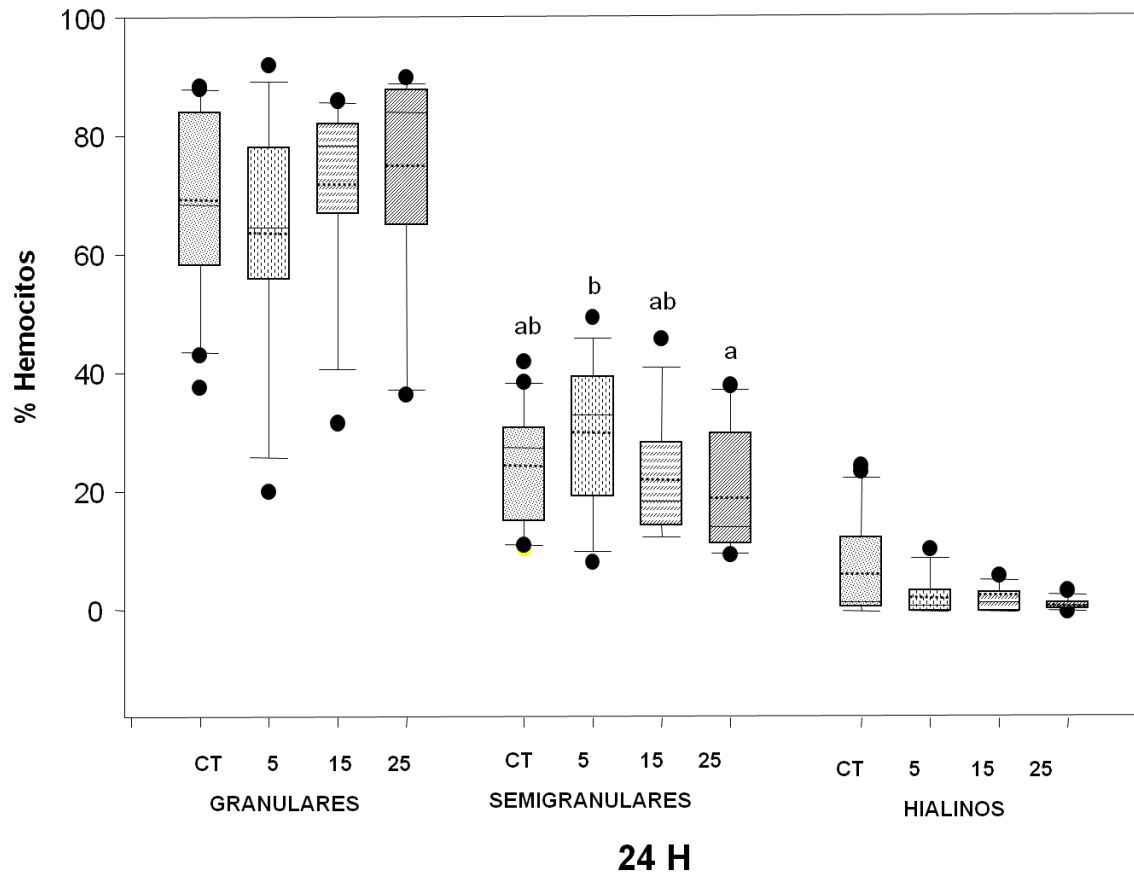
A las 6 h post exposición se observó un aumento en el porcentaje de HG conforme aumentó la dosis de Diazinón ( de CT a 25 µg de Diazinón/ g camarón: 45.04%, 51.42%, 63.02%, 67.21% cel/ ml hemolinfa), revirtiéndose la tendencia en HSG y HH, que tienden a disminuir de manera dependiente de la dosis (de CT a 25 µg de Diazinón/ g camarón, HSG: 49.03%, 45.80%, 33.94%, 31.44% y HH: 7.27%, 6.60%, 0.64%, 0.53% cel/ ml hemolinfa). A pesar de la relación inversa entre HG y HSG, en ambos tipos de hemocitos se observaron diferencias significativas entre la dosis más alta (25 µg de Diazinón/ g camarón) con respecto al control ( $p < 0.001$ ) para ambos), mientras que en HH no se presentaron diferencias significativas entre ningún tratamiento ( $p= 0.085$ ) (Fig. 18).



**Figura 18.** Recuento diferencial de hemocitos de *L. vannamei* expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6 h. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos de cada tipo de hemocitos ( $p \leq 0.05$ ). CT= control, HH= Hemocitos hialinos, HSG= Hemocitos semigranulares y HG= Hemocitos granulares.

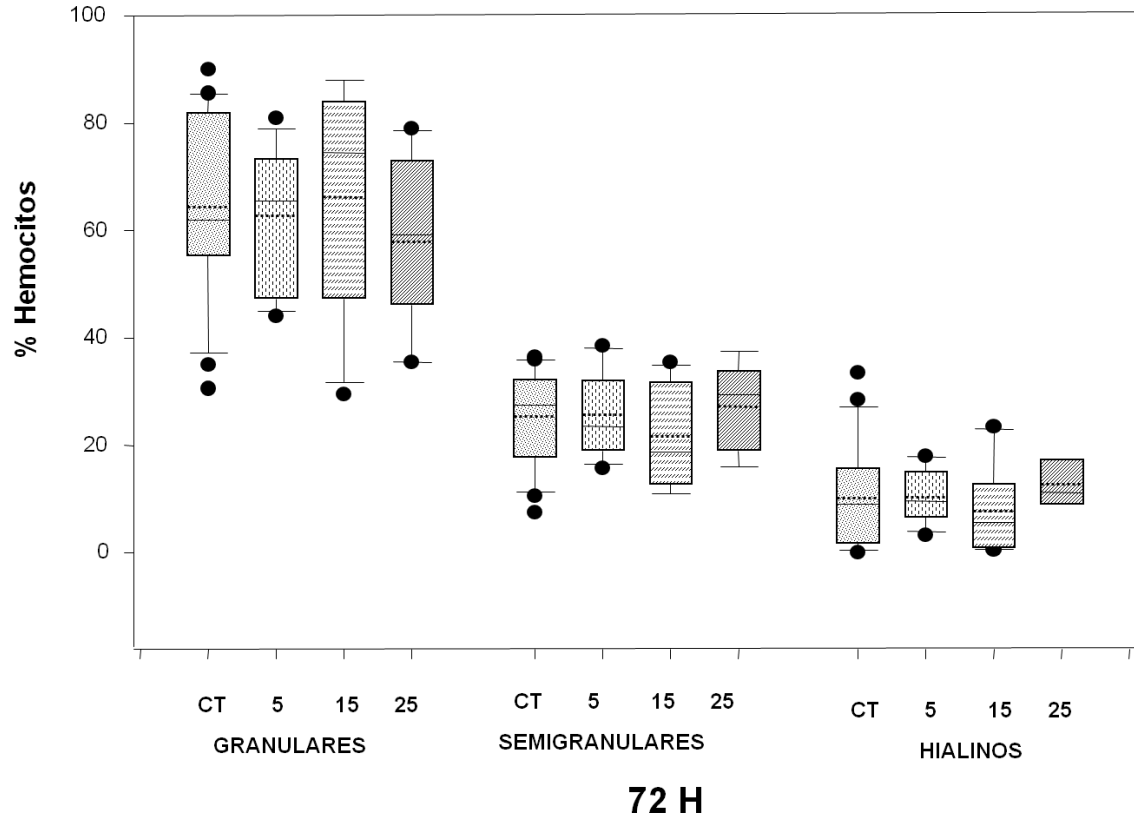
A las 24 h post exposición se observó una relación inversa entre HG y HSG, siendo más evidente en las dosis de 5 y 25 µg de Diazinón/ g camarón. En la dosis de 5 µg de Diazinón/ g camarón se obtuvo el menor porcentaje de HG (63.67 %) y en la dosis de 25 µg de Diazinón/ g camarón se obtuvo el mayor porcentaje (75.18 %), sin diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p= 0.066$ ). Contrario a esto, en los HSG el mayor porcentaje se obtuvo en la dosis de 5 µg de Diazinón/ g camarón (30.08 %) y el menor porcentaje en la dosis de 25 µg de Diazinón/ g camarón (19.07 %), con diferencias significativas entre ambos tratamientos ( $p= 0.006$ ). El porcentaje de HH disminuyó de manera dependiente de la dosis (de CT a 25 µg de Diazinón/

g camarón: 6.25, 2.34, 1.8, 1.08 % cel/ ml hemolinfa), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos ( $p= 0.085$ ) (Fig. 19).



**Figura 19.** Recuento diferencial de hemocitos (RDH) de *L. vannamei* expuesto a 5, 15 y 25  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón a 24 h. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos de cada tipo de hemocitos ( $p \leq 0.05$ ). CT= control, HH= Hemocitos hialinos, HSG= Hemocitos semigranulares y HG= Hemocitos granulares.

A las 72 h post exposición, se observó que en las proporciones de los 3 tipos de hemocitos fueron muy similares a las obtenidas en el control, sin presentarse diferencias significativas entre tratamientos ( $p > 0.23$ ,  $p > 0.22$ , y  $p = 0.08$ ), lo cual indica que los organismos que sobrevivieron la exposición al plaguicida entraron en una fase de recuperación, restableciendo el porcentaje de hemocitos (Fig. 20).



**Figura 20.** Recuento diferencial de hemocitos de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 72 h. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos de cada tipo de hemocitos ( $p \leq 0.05$ ). CT= control, HH= Hemocitos hialinos, HSG= Hemocitos semigranulares y HG= Hemocitos granulares.

En general se encontró que los tipos de hemocitos que predominaron independientemente de los tiempos y los tratamientos fueron los HG, seguidos de los HSG y de los HH. Esto pudo deberse a que los HG almacenan en sus gránulos la mayoría de los efectores inmunológicos, y por tal motivo se encuentran en mayor proporción en la hemolinfa para posteriormente ser transportados a los lugares donde sean necesarios (Van de Braak *et al.*, 2002). Una relación similar a la del presente estudio fue obtenida por Cárdenas *et al.* (2000), quienes mediante microscopía electrónica, observaron que en el cangrejo de río *Procambarus zonangulus* estimulado con zimozan, los hemocitos granulares aparentemente fueron más abundantes que los

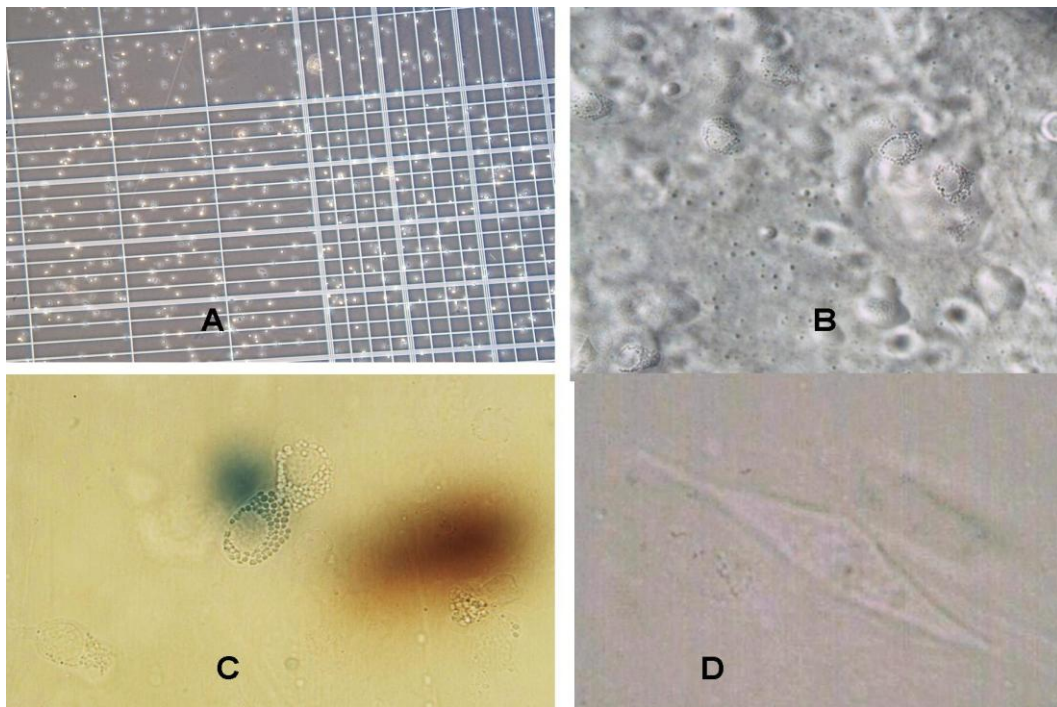
hemocitos semigranulares (9-13%, y 2%, respectivamente). Por lo contrario, hay otros autores que reportan una menor proporción de hemocitos granulares o no reportan cambios en los diferentes tipos de hemocitos durante infección por virus del síndrome de taura (Song *et al.*, 2003), o ante la presencia del virus de la mionecrosis infecciosa (Costa *et al.*, 2009).

Ante la presencia de algún factor que cause estrés en los organismos, los hemocitos se desgranulan para activar el sistema inmunológico, mediante funciones específicas de cada tipo de hemocito, así mismo éstos pueden movilizarse hacia tejidos o sitios dañados, y redistribuirse. Los hemocitos activados estimulan a su vez la hematopoyesis, aumentando la efectividad del sistema de defensa del organismo (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Como se mencionó anteriormente, el mecanismo exacto que ejercen los plaguicidas sobre parámetros inmunológicos no es muy claro, sin embargo en el presente estudio, se pudo observar que ante la presencia del plaguicida Diazinón se presentaron cambios en los porcentajes de los tipos de hemocitos de manera dependiente de la dosis, siendo más evidentes a las 6 h.

Así mismo, se observaron tendencias inversas entre el porcentaje de hemocitos granulares con respecto a los hemocitos semigranulares y hialinos en los tres tiempos. Estas relaciones inversas pueden deberse a la función específica de cada tipo de hemocito, por ejemplo, los HSG son los más sensibles, ya que ante algún estímulo éstos son los primeros que reaccionan desgranulándose para liberar a la hemolinfa el contenido vesicular; este contenido a su vez, estimula a los hemocitos granulares para desgranularse y liberar a la hemolinfa los componentes humorales, como los zimógenos de proFO y la enzima activadora de la proFO, proteínas, entre otras (Holmblad y Soderhall, 1999). Por su parte, los hemocitos hialinos (HH) sólo intervienen en la fagocitosis, pero durante este proceso se da la producción de especies reactivas de oxígeno, siendo el anión superóxido el principal radical producido durante el estallido respiratorio. Por lo tanto, este tipo de hemocitos (HH)

pueden relacionarse con la actividad de la enzima superóxido dismutasa, la cual es la encargada de dismutar el anión superóxido (Vargas-Albores y Barracco, 2001).

Aunque la inmunotoxicidad de plaguicidas en mecanismos celulares y moleculares no ha sido muy estudiado, se ha encontrado que los plaguicidas reprimen respuestas inmunes humorales y celulares y son diferencialmente afectadas por diferentes plaguicidas (Banerjee, 1999). Esta relación puede deberse a que las esterasas asociadas a las membranas celulares de los hemocitos también pueden ser inhibidas y pueden dar cambios estructurales o funcionales en poblaciones de hemocitos (Galloway y Handy, 2003).



**Figura 21.** Hemocitos granulares, semigranulares y hialinos. A) vista desde el ocular 20x; B) vista desde ocular 60x; C) hemocitos granulares y actividad fenoloxidasas; D) Hemocito hialino.

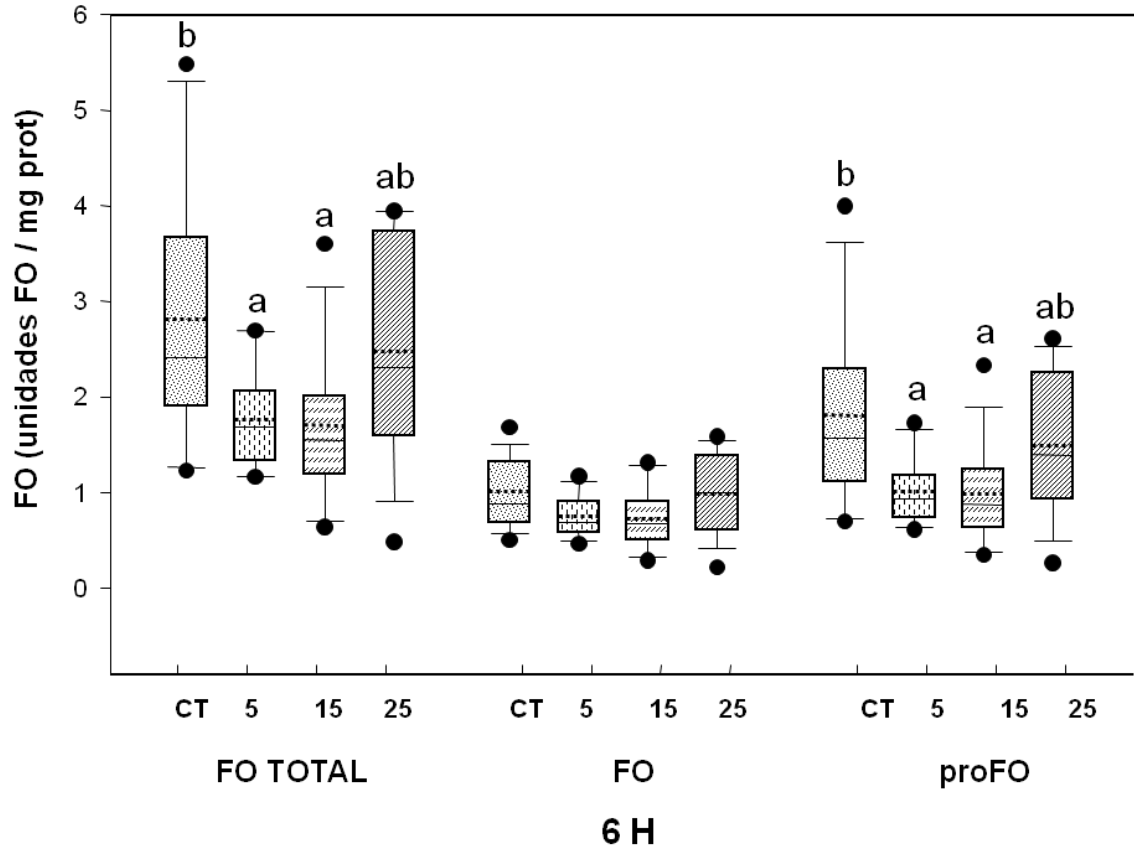


## 7.6 Actividad de Fenoloxidasa Total, Fenoloxidasa (FO) y Profenoloxidasa (proFO)

En crustáceos, la biosíntesis de la melanina, pigmento oscuro al cual se le adjudican diversas propiedades biológicas, se produce mediante el sistema profenoloxidasa. Dicho sistema se encuentra en forma inactiva dentro de los hemocitos (proFO), pero ante la presencia de agentes extraños se activa a Fenoloxidasa (FO) desencadenando una compleja cascada de reacciones para finalmente producir melanina (Perazzolo *et al.*, 2002; Vargas-Albores y Barracco, 2001).

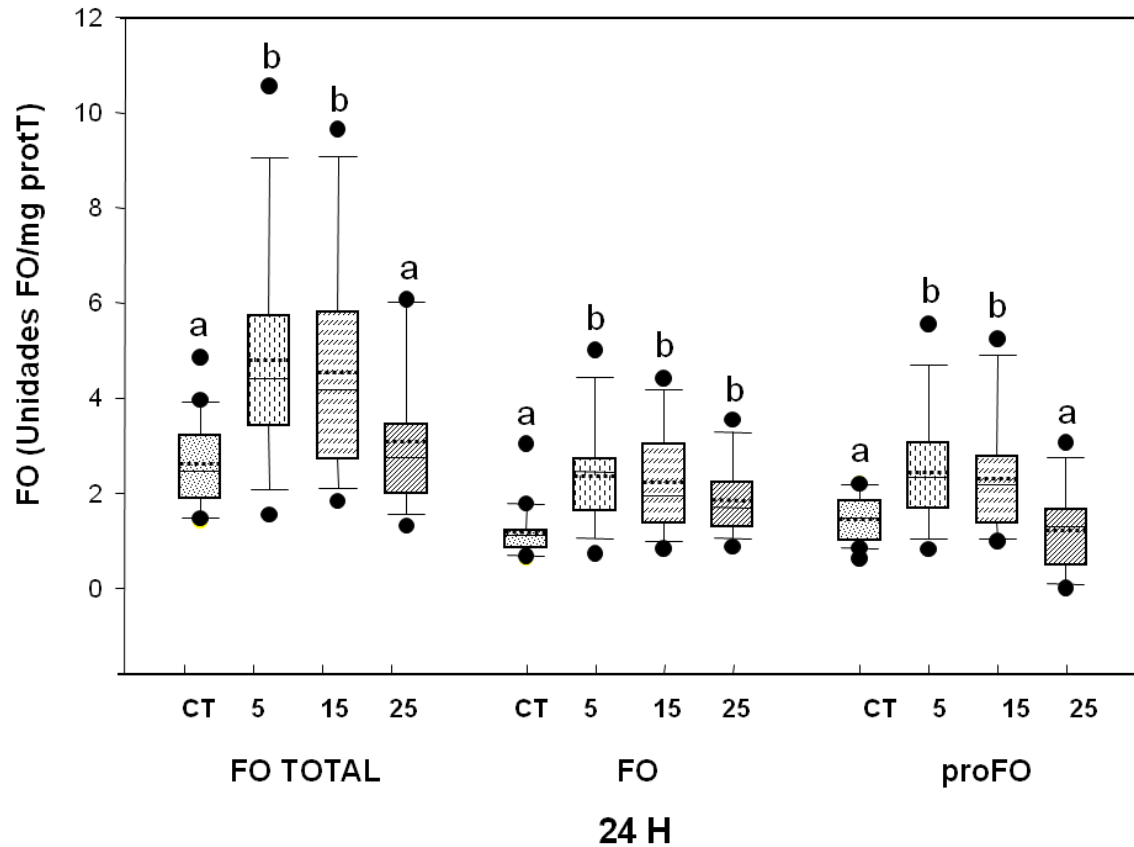
En el presente estudio se evaluó la actividad de la Fenoloxidasa total (FO Total), la Fenoloxidasa (FO) y la profenoloxidasa (proFO) en células lisadas de hemocitos de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6, 24 y 72 h, cuyos resultados obtenidos se muestran en las figuras 21, 22, y 23.

De manera general se observó que las tendencias obtenidas en la actividad de FO total, FO y proFO fueron similares a las 6 y 24 h, pero a las 72 h la tendencia fue diferente. A las 6 h post exposición, en las dosis de 5 y 15 µg de Diazinón/ g camarón se observó una menor actividad de FO Total (1.76 y 1.70 unidades FO/ mg prot, respectivamente), y también de proFO (1.01 y 0.98 unidades FO/ mg prot), respectivamente), con diferencias significativas respecto al control (FO total:  $p < 0.01$  y proFO:  $p < 0.007$  para ambas dosis). En la actividad de FO, los menores valores también se presentaron en las dosis de 5 y 15 µg de Diazinón/ g camarón (0.75 y 0.72 unidades FO/ mg prot), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Así mismo, en la dosis de 25 µg de Diazinón/ g camarón en las 3 actividades se observó un aumento respecto a las dosis menores, sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). (Fig. 21).



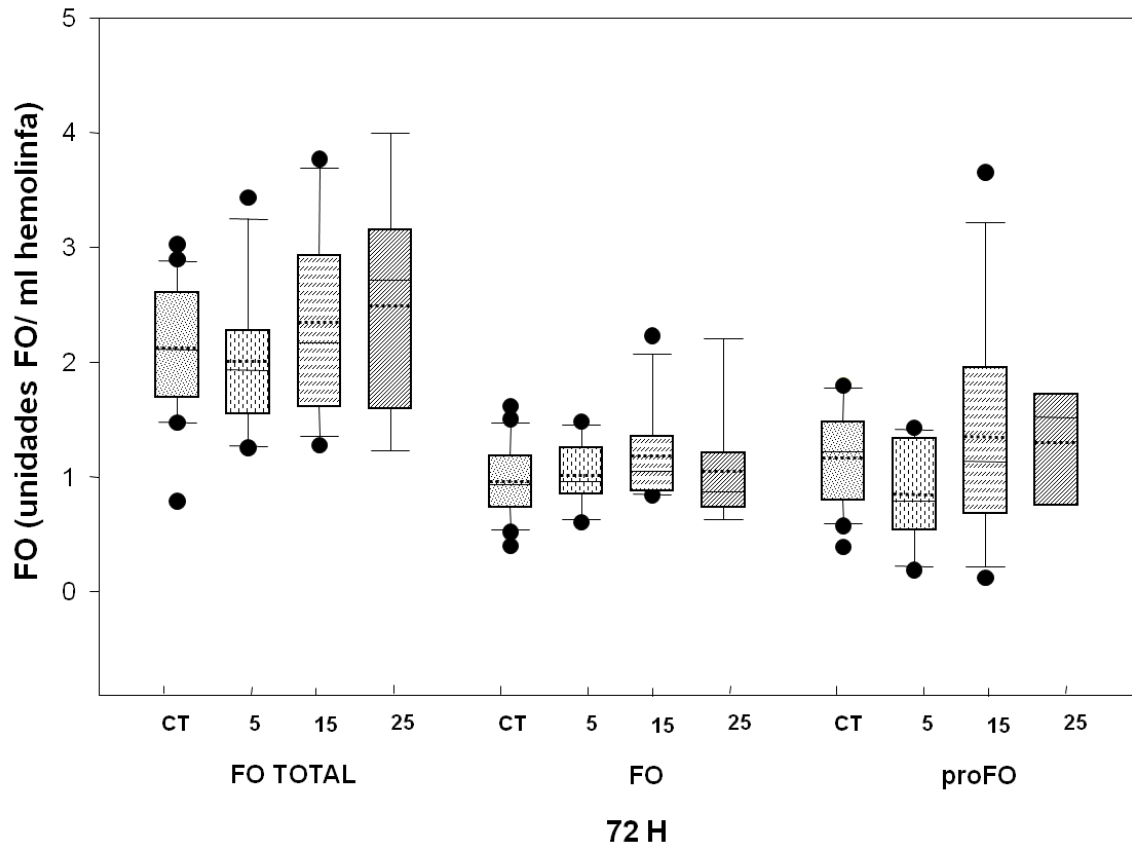
**Figura 22.** Actividad de Fenoloxidasa total, Fenoloxidasa y profenoloxidasa de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 6 h. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas a cada tiempo ( $p \leq 0.05$ ).

Contrario a la tendencia de las 6 h, a las 24 h post exposición, se observó un aumento en las dosis de 5 y 15 µg de Diazinón/ g camarón en la actividad de FO Total (4.79 y 4.53 unidades FO/ mg prot, respectivamente) y proFO (2.43 y 2.30 unidades FO/ mg prot, respectivamente), con diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.001$  para FO total y  $p = 0.002$  para proFO). En la actividad de FO, se observó un aumento de actividad en todos los tratamientos con diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ) (Fig. 22).



**Figura 23.** Actividad de fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 24 h. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre cada tiempo de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

A las 72 h post exposición no se presentaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos para ninguna de las tres actividades ( $p > 0.05$ ). (Fig. 23).



**Figura 24.** Actividad de fenoloxidasa total, fenoloxidasa y profenoloxidasa de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a 72 h. Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre cada tiempo de muestreo ( $p \leq 0.05$ ).

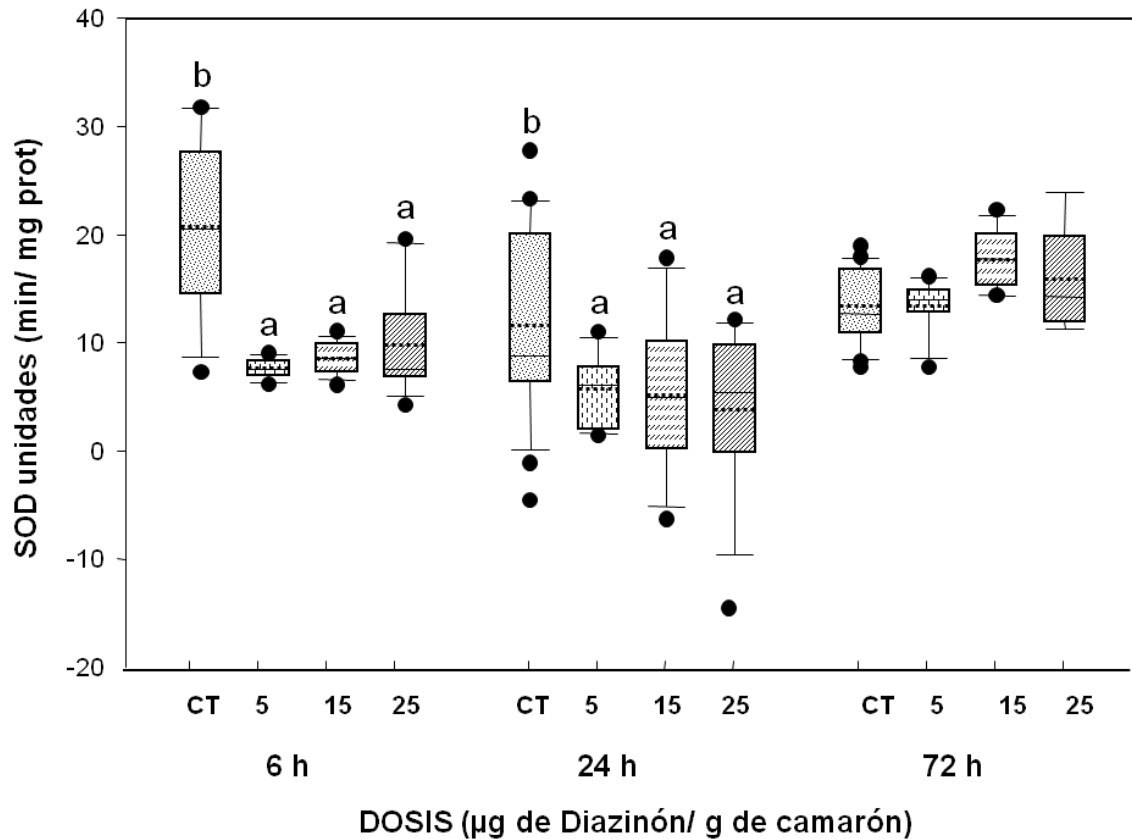
A pesar de que el mecanismo de activación del sistema profenoloxidasa ante la presencia de un xenobiótico no es tan conocido como el mecanismo de activación ante la presencia de algún patógeno, en el presente estudio se puede observar que hay una relación entre la activación de FO con el porcentaje de hemocitos granulares. Esta respuesta puede deberse a que los hemocitos granulares son los principales efectores de las respuestas humorales, debido a que contienen en mayor cantidad dichos componentes, entre ellos el zimógeno proFO y la enzima activadora ppA, los cuales quedan disponibles en la hemolinfa después de la desgranulación.

Yeh *et al.*, 2005 sugieren que ante la presencia del organofosforado Triclorfon, éste puede perturbar el balance ácido-base de los camarones, y a su vez provocar una disminución en la actividad de fenoloxidasa, induciendo el estallido respiratorio, lo cual repercute en el debilitamiento del sistema inmune. Esto podría ser otro camino de activación de la actividad fenoloxidasa en el presente estudio, ya que se ha reportado que dicha actividad también puede tener actividad peroxidativa.

Algunos autores han reportado que el sistema proFO puede ser activado por inmunoestimulantes bióticos ( $\beta$ -1, 3- glucanos, zimosan, lipopolisacáridos, peptidoglucanos, y laminarin), por varios factores ambientales y biológicos, incluyendo calcio, dodecilsulfato, tripsina, aumento de temperatura, exposición a plaguicidas y estadio de muda (Chuo *et al.*, 2005). Así mismo también se han observado disminuciones en la actividad de Fenoloxidasa ante la presencia de la bacteria *V. alginilotycus* en el camarón *F. indicus* (Sarathi *et al.*, 2007), expuesto a ésteres de ftalato (Cheng y Sung, 2005), y expuesto al plaguicida organofosforado Triclorfon a altas concentraciones (0.2 y 0.3 mg/ l) (en *M. rosenbergii* (Yeh *et al.*, 2005)

## **7.7 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)**

En la actividad de superóxido dismutasa a las 6 y 24 h post exposición se obtuvo una menor actividad en los tratamientos (5, 15 y 25  $\mu$ g de Diazinón/ g camarón) con diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.001$ ). A las 72 h post exposición no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Fig. 24)



**Figura 25.** Actividad de superóxido dismutasa en hemolinfa de *L. vannamei* expuestos a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre cada tiempo ( $p \leq 0.05$ ). CT= control.

Se puede inferir que los camarones a las 6 y 24 h de exposición al plaguicida Diazinón provocó una producción excesiva de ROS que a su vez, alteró la actividad de la enzima antioxidante SOD en los tratamientos. Sin embargo, a las 72 h, los valores de la actividad de SOD en los tratamientos fueron muy similares a los obtenidos en el control a las 6 y 24 h, lo cual indicó una aparente recuperación de los organismos. Al respecto, Kristoff *et al.*, (2008), señalan que después de una sobreproducción de ROS, los organismos pueden activar mecanismos compensatorios tal como el incremento de los niveles de las enzimas antioxidantes, como la SOD para evitar el daño oxidativo. Por lo tanto, las actividades de las enzimas antioxidantes pueden ser

resultado de la capacidad de síntesis de la enzima por el propio organismo ó de la inactivación de la enzima por algún agente estresor (Li *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en la hemolinfa de camarón concuerdan con los de Vijayavel y Balasubramanian (2009), quienes observaron una disminución en las actividades de antioxidantes (SOD, catalasa, glutatión peroxidasa, vitamina C y E) en hepatopáncreas, músculo y branquias del camarón *P. Monodon* expuesto al insecticida piretroide Fenvelarato durante 15 días. Estos resultados sugieren que los plaguicidas causan altos niveles de producción de ROS, lo cual desde el punto de vista inmunológico resulta benéfico debido a su actividad microbicida. Sin embargo, la sobreproducción continua de ROS puede provocar una disminución en las actividades de enzimas antioxidantes como la SOD y CAT (Kristoff *et al.*, 2008; Banerjee, 1999), y es cuando se produce un daño oxidativo en tejidos y macromoléculas (incluyendo ADN, proteínas y lípidos) y el organismo no puede recuperarse (Xian *et al.*, 2010; Banerjee, 1999). Este fenómeno se ha reportado en diversos estudios por efecto de virus (Pan *et al.*, 2008; Mathew *et al.*, 2007; Mohankumar y Ramasamy, 2006; Song *et al.*, 2003).

## **7.8 Peroxidación de Lípidos (LPO)**

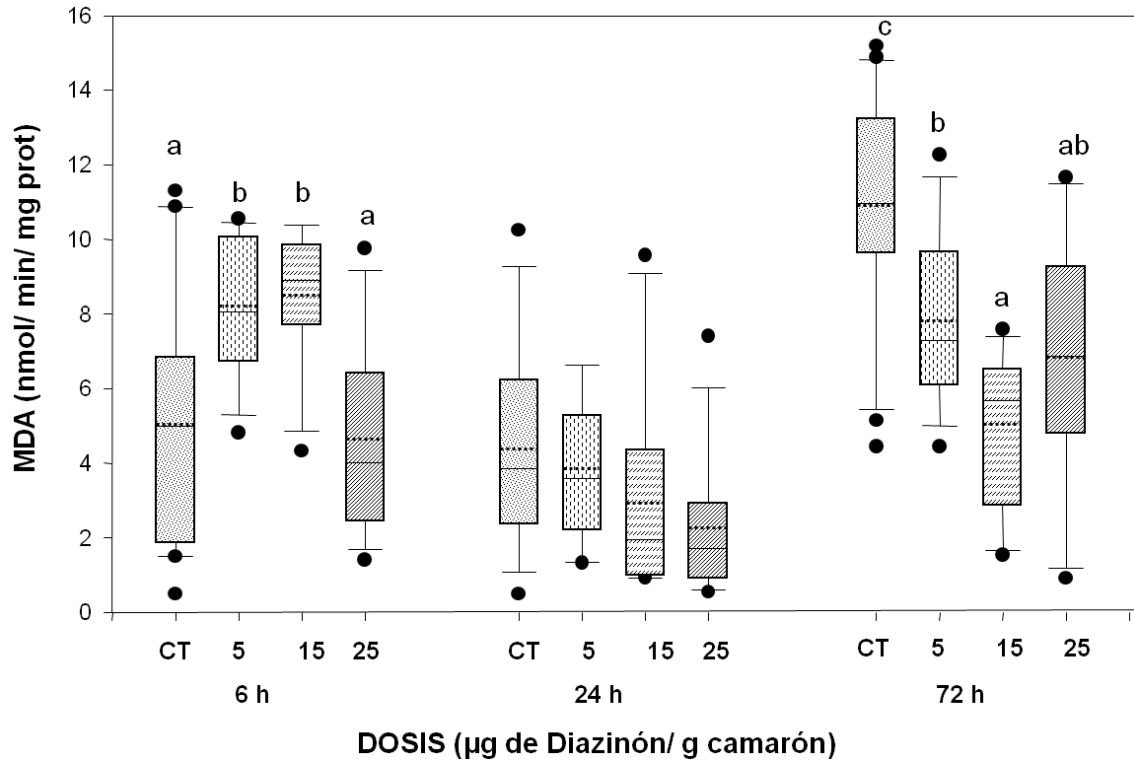
La peroxidación de lípidos es un proceso complejo en el cual se da la interacción del oxígeno molecular, o las especies reactivas de oxígeno (ROS) con los ácidos grasos poliinsaturados (Vijayavel y Balasubramanian, 2009). Durante este proceso se forman algunos hidroperóxidos lípidos, que subsecuentemente forman algunos subproductos entre los que se encuentran: alcanos, alquenos hidroxialquenes y cetonas, los cuales pueden dañar la membrana causando la pérdida de la homeostasis celular, lo que provoca daños en el ADN y proteínas (Richardson *et al.*, 2008).

El malondialdehído (MDA) es un producto de descomposición de hidroperóxidos lípidos, y ha sido usado como un indicador general de estrés tóxico derivado de varios tipos de contaminación en invertebrados acuáticos (Dutra *et al.*, 2008).

Por lo tanto, en el presente estudio se determinó la peroxidación de lípidos en organismos expuestos a diferentes dosis del plaguicida organofosforado Diazinón a diferentes tiempos (6, 24 y 72 h) (Fig. 25).

A las 6 h post exposición, se observó una mayor peroxidación de lípidos en las dosis de 5 y 15  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón con diferencias estadísticas respecto al control (4.63 y 2.26 nmol/ min/ mg prot, respectivamente) y a la dosis de 25 $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón. A las 24 h post exposición no se presentaron diferencias significativas entre ningún tratamiento. En cambio a las 72 h se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos respecto al grupo control ( $p < 0.001$ ) (Fig. 25).





**Figura 26.** Contenido de malondialdehído (MDA) como producto de la peroxidación de lípidos en hemolinfa de *L. vannamei* expuesto a 5, 15 y 25 µg de Diazinón/ g camarón a diferentes tiempos de muestreo (6, 24 y 72 h). Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre cada tiempo de muestreo ( $p \leq 0.05$ ). CT= control.

Los resultados de LPO fueron inversos a los obtenidos en la antioxidante SOD, por lo cual se puede atribuir que ante la exposición al plaguicida los mecanismos de defensa antioxidantes fueron sobrerregulados en respuesta al incremento de ROS. El efecto del plaguicida Diazinón fue evidente a las 6 h donde se obtuvo mayor peroxidación de lípidos en las dosis de 5 y 15 µg de Diazinón/ g camarón, pero a las 24 y 72 h, los organismos fueron capaces de adaptarse a tales fluctuaciones de estrés, induciendo la síntesis adicional de enzimas antioxidantes para regular el daño oxidativo, y de esta manera se pudo reducir la peroxidación de lípidos. Cabe señalar que a las 72 h se obtuvo mayor LPO en el control, esto puede deberse a que la mayoría de los organismos control a las 72 h se encontraban en la fase de premuda tardía que se caracteriza por la disminución de alimento o anorexia, y los niveles de actividad

del sistema inmune bajan y por lo tanto son más susceptibles a sufrir LPO o alguna enfermedad.

En otros estudios se ha observado un aumento en la peroxidación de lípidos en las branquias del camarón *P. monodon* expuesto a Deltametrin (0.1 g/l) (Dorts *et al.*, 2009). Así mismo, Vijayavel y Balasubramanian (2009) evaluaron el efecto del piretroide Fenvalerato en hepatopáncreas, músculo y branquias del camarón *P. monodon*, observando una inducción significativa en la peroxidación de lípidos en los tres tejidos. Por el contrario, en otros estudios se ha observado una tendencia a disminuir la peroxidación de lípidos como el de DeLorenzo y De León (2010), quienes observaron disminución en la LPO en camarones adultos *P. pugio* conforme aumentó la concentración de Etofenprox (0.11, 0.33 y 1.0 µg/l etofenprox), observándose a su vez una tendencia contraria en las actividades antioxidantes. En juveniles de *D. magna* expuestos a niveles subletales de Cd y Paraquat, también se observó una disminución en la LPO y una inducción de enzimas antioxidantes, lo cual puede indicar que los organismos expuestos al plaguicida, activaron su sistema de defensa antioxidante y evitaron que los ROS reaccionaran con membranas y otros lípidos y de esta manera disminuyeron el daño de la peroxidación de lípidos (Barata *et al.*, 2005).

Aunque no es bien conocida la relación sistema inmune- sistema antioxidante en invertebrados, los diversos resultados obtenidos en el presente estudio nos demuestran que efectivamente existe una relación entre estos dos sistemas. Los efectos pudieron deberse a la acción directa del plaguicida en la respuesta inmunológica, o como consecuencia indirecta por el efecto del plaguicida Diazinón sobre el sistema colinérgico con la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, subsecuentemente esta hiperactividad colinérgica aumenta la producción de ROS, con lo cual se desencadena la activación del sistema antioxidante, como la SOD, para tratar de contrarrestar los ROS producidos, y si la exposición continua, y a su vez continúa la producción de ROS excediendo la capacidad del sistema antioxidante para contrarrestarlos se produce estrés oxidativo, el cual puede medirse mediante la LPO.

En crustáceos como el camarón, los hemocitos son los encargados de realizar las principales funciones inmunológicas, ya sea mediante respuestas humorales, como la fenoloxidasa (FO), ó por respuestas celulares como fagocitos o encapsulación. Esto se vio demostrado en los recuentos de hemocitos, en los cuales se observaron disminuciones respecto a la concentración del plaguicida a etapas iniciales. Además a dosis altas se encontró mayor cantidad de de hemocitos granulares, los cuales contienen mayor cantidad de componentes del sistema inmune, y a su vez, se observó una disminución de hemocitos semigranulares, los cuales son necesarios para estimular la desgranulación de los hemocitos granulares. La cantidad de hemocitos granulares además coincidió con la actividad de la fenoloxidasa, un proceso clave en la defensa inmunológica del camarón, debido a que este proceso se produce la melanina, que es importante para la curación de heridas. Así mismo la producción de melanina también está relacionada con la producción de ROS, ya que éstos son producidos durante el desarrollo de producción de melanina, y actúan como mecanismo microbicida. A su vez, durante el estallido respiratorio se da la producción de ROS, y debido a que el principal radical formado es el anión superóxido, la actividad de la enzima

antioxidante superóxido dismutasa es de vital importancia en mantener el balance homeostático del huésped, ya que esta dismuta el anión superóxido en peróxido de hidrógeno y agua. Pero aunque la producción de ROS es un importante mecanismo microbicida, cuando la producción de ROS es excesiva y sobrepasa la capacidad de la antioxidante se produce un daño oxidativo.

De esta manera el organismo puede morir debido al daño oxidativo producido, o puede morir por alguna enfermedad, ya que con el debilitamiento del sistema inmune o el sistema colinérgico, el organismo queda más susceptible a enfermedades. Sin embargo, tal como se observó en el presente estudio a menor concentración del contaminante y una pequeña duración de exposición, los organismos pueden responder con vías bioquímicas adaptativas, incrementando la concentración de enzimas que intervienen en la homeostasis y de esta manera pueden recuperarse después de la exposición al plaguicida, como se vio reflejado en el presente estudio donde a las 6 h se observó una rápida y máxima inducción, luego a las 24 h post exposición en algunas respuestas se observan efectos pero a su vez se observa la adaptación de los organismos, y a las 72 h finalmente se observa la recuperación de los organismos en la mayoría de las respuestas evaluadas, excepto en el músculo

## VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Se encontró una DL50 de 30 µg de Diazinón/ g camarón
  
- ❖ La actividad de la enzima AChE presentó una mejor respuesta en hemolinfa que en músculo a pesar de que fueron actividades más altas. En músculo los efectos se presentaron hasta las 72 h en las dosis más altas. En hemolinfa a las 6 y 24 h se presentó una inhibición de AChE dependiente de la concentración.
  
- ❖ El recuento total de hemocitos disminuyó a las 6 y 24 h de manera dependiente de la concentración, mientras que a las 72 h no hubo diferencias entre tratamientos.
  
- ❖ En el RDH, en general durante los tres periodos de exposición se observó un mayor porcentaje de hemocitos granulares (HG), seguidos por hemocitos semigranulares (HSG) y en menor proporción los hemocitos hialinos (HH). A las 6 y 24 h la proporción de hemocitos granulares aumentó conforme aumentó la dosis del plaguicida, mientras que en los semigranulares y hialinos sucedió lo contrario. A las 72 h no hubo diferencias entre las proporciones de hemocitos en los tratamientos.
  
- ❖ La actividad de SOD a las 6 y 24 h post exposición disminuyó en los tratamientos. Pero a las 72 h post exposición se presentaron actividades similares a las del control.

❖ En la LPO, a las 6 h post exposición se observó alta peroxidación en las dosis de 5 y 15  $\mu\text{g}$  de Diazinón/ g camarón. Sin embargo a las 24 y 72 h no se observa tendencia.

❖ La exposición al plaguicida organofosforado Diazinón provocó un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual se vio reflejado a las 6 h post exposición donde efectivamente se presentó una baja actividad de superóxido dismutasa (SOD) y una alta peroxidación (LPO).

❖ En general las respuestas observadas en *L. vannamei* expuestos al plaguicida Diazinón, nos demuestran que a etapas iniciales post exposición se presentaron los efectos, a las 24 h post exposición la mayoría de las respuestas nos indica que los organismos comenzaron una fase de recuperación, y finalmente a las 72 h los organismos no presentaron efecto, lo cual pudo deberse a la recuperación del organismo.

## IX. RECOMENDACIONES

- ❖ Los resultados obtenidos en el presente estudio nos demuestran una aparente fase de recuperación a las 72 h, sin embargo sería necesario pruebas de toxicidad subletales a un mayor tiempo post exposición o realizar pruebas de toxicidad letal con muestreos continuos para observar el comportamiento del organismo.
- ❖ Debido al escaso número de estudios en relación del sistema profenoloxidasa ante la presencia de plaguicidas sería recomendable seguir este camino de investigación.
- ❖ Realizar más pruebas de toxicidad con Diazinón incluyendo la evaluación del anión superóxido, el cual es el primer radical libre formado durante el estallido respiratorio.
- ❖ Evaluar las respuestas incluidas en el presente estudio pero comparando varios tejidos o probando diferentes métodos de exposición.

## X. LITERATURA CITADA

- Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P. & Lomri A., (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74: 324- 329.
- Ai HS., Liao JX., Huang XD., Yin ZX., Weng SP., Zhao ZY., Li SD., Yu XQ. & He JG. (2009). A novel prophenoloxidase 2 exists in shrimp hemocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 33: 59–68.
- Aydın R. & Köprücü K., (2005). Acute toxicity of diazinon on the common carp (*Cyprinus carpio*) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 82: 220–225.
- Bachere E. (2000). Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191: 3–11.
- Bailey-Brock JH. & Moss SM. (1992). Penaeid taxonomy, biology and zoogeography. In: Fast AW, Lester JL (eds) *Marine shrimp culture: principles and practices*, Vol. 23. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p 9-27.
- Banerjee B.D., Seth V., Bhattacharya A., Pasha ST. & Chakraborty AK. (1999). Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters* 107: 33–47.
- Barata C., Inma Varo T., Navarro J.C., Arun S. & Porte C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 140: 175–186.
- Bejarano-González. (2002). *La espiral del veneno: guía crítica ciudadana sobre plaguicidas*. Texcoco, Edo de México. RAPAM, Junio, pp226.
- Betancourt-Lozano & García de la Parra, en prensa. Perspectivas ecotoxicológicas de la utilización del camarón blanco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), en ambientes costeros del Pacífico mexicano.
- Betancourt-Lozano M., Baird D., Sangha R. & González-Farias F. (2006). Induction of Morphological Deformities and Moulting Alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) Juveniles Exposed to the Triazole-Derivative Fungicide Tilt. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 51: 69–78.



- Bhavan S. & Geraldine P. (2001). Biochemical Stress Responses in Tissues of the Prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on Exposure to Endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70: 27–41.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Calva LG. & Torres MR. (1998). Plaguicidas organoclorados. *Contactos* 30: 35- 46.
- Campa- Córdova A.I., Hernández- Saavedra N.Y., Philippis R. & Ascencia F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 12: 353–366.
- Carbajal- Hernández A.L. (2007). Ruta de infección del virus de la mancha blanca (WSSV) en *Penaeus vannamei* (Boone, 1931) mediante infección vía oral. Tesis Maestría Universidad de Sonora.
- Cárdenas W., Jenkins J.A., & Dankert J.R. (2000). A Flow Cytometric Approach to the Study of Crustacean Cellular Immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* 76: 112–119.
- Cerón JJ., Ferrando MD., Sancho E., Gutierrez- Panizo C. & Andreu- Moliner E. (1996). Effects of Diazinon Exposure on Cholinesterase Activity in Different Tissues of European Eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicology and environmental safety* 35: 222–225.
- Chang CC, Lee PP., Liu CH. & Cheng W. (2006). Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 574- 585.
- Cheng W., Chieu HT., Tsai CH. & Chen JC. (2005). Effects of dopamine on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 19: 375- 385.

- Chiu CH., Guu YK., Liu CH., Pan TM. & Cheng W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp *Litopenaeus vannamei* induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish & Shellfish Immunology* 23: 364- 377.
- Chuo CP., Liang SM. & Sung HH. (2005). Signal transduction of the prophenoloxidase activating system of prawn haemocytes triggered by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 149- 162.
- CICOPLAFEST. (2004). Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Comercio y fomento Industrial, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y Secretaría de Salud. México, D.F
- Comoglio L., Amin O., Roque A., Betancourt-Lozano M., Anguas D., & Haro BM., (2005). Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 66–74.
- Corbera E., Kosoy N. & Martínez Tuna M. (2007). Equity implications of marketing ecosystem services in protected areas and rural communities: Case studies from Meso-America. *Global Environmental Change* 17: 365–380.
- Corona A, Soto LA. & Sánchez AJ. (2000). Epibenthic amphipod abundance and predation efficiency of the pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Burkenroad 1939) in habitats with different physical complexity in a tropical estuarine system. *Journal of experimental marine biology and ecology* 253:33-48.
- Costa A., Buglione C., Bezerra F., Martins P. & Barracco M. (2009). Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. *Aquaculture* 291: 141–146.
- Couch JA. (1978). Diseases, parasites, and toxic responses of commercial penaeis shrimps of the Gulf of Mexico and South Atlantic coasts of North America. *Fish Bull.* 76(1):1-44.
- Dauterman WC., (1971). Biological and Nonbiological Modifications of Organophosphorus Compounds. *Bull. Wld Hlth Org* 44, 133-150.
- DeLorenzo M., & De Leon R. (2010). Toxicity of the Insecticide Etofenprox to Three Life Stages of the Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Arch Environ Contam Toxicol* 58: 985–990.

- Devine G.J., Eza D., Oigusuku E. & Furlong M.J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 25(1): 74-100.
- De Zwart L.L., Meerman J., Commandeur J. & Vermeulen N. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.26, Nos 1/2, pp 202- 226.
- Dias Bairy A. (2000). Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* 191: 163–168
- Domingues I., Agra A.R., Monaghan K., Soares A. & Nogueira A. (2010). Cholinesterase and glutathione- S- transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29, No. 1, pp. 5–18.
- Durmaz H., Sevgiler Y. & Üner N. (2006). Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 84: 215–226.
- Dutra B.K., Santos R.B., Bueno A.A.P. & Oliveira G.T. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: 322–328.
- Dutta H.M. & Meijer H.J.M. (2003). Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental Pollution* 125: 355–360.
- Ellman G.L., Courtney D., Andres Jr & Featherstone R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 7: 88-95.
- EPA. (2004). Interim Reregistration Eligibility Decision Diazinon. EPA 738-R-04-006
- Escobedo-Bonilla C.M., Audoorn L., Wille M., Alday-Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. & Nauwynck H.J. (2006). Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of aquatic organisms* Vol. 68: 181–188.

- Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday Sanz V., Sorgeloos P., Pensaert M.B. & Nauwynck H.J. (2005). *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* by intramuscular and oral routes. *Diseases of aquatic organisms* Vol. 66: 163–170.
- Esposito E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M. & Algeri S. (2002). A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging* 23: 719–735.
- Esterbauer H., Schaur R. & Zollner H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine* 11: 81-128.
- Eto M. (1974). *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*. CRC Press, Inc., Ohio.
- Franco R., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E. & Panayiotidis M. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research* 674: 3–22.
- Fridovich I. (2004). Superoxide Dismutase. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Volume 4.
- Fulton M. & Key P. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 1, pp. 37–45.
- Galindo- Reyes JG, Dalla-Venezia L. & Lazcano-Alvarez MG. (2002). Effect of some organophosphorus pesticides on oxygen consumption of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52: 134- 136.
- Galindo-Reyes JG., Medina- Jasso A. & Villagrana-Lizárraga C. (1996). Toxic effects of organochlorine pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, Mexico. *Chemosphere*, Vol. 33, No. 3, pp. 567-575.
- Galloway T. & Depledge M. (2001). Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance. *Ecotoxicology* 10: 5-23.

- Galloway T., Millward N., Browne M. & Depledge M. (2002). Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 61: 169–180.
- García-de la Parra LM, Bautista-Covarrubias JC, Rivera-de la Rosa N, Betancourt-Lozano M & Guilhermino L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65:372-380.
- Girón-Pérez I., Zaitseva G., Casas-Solis J. & Santerre A. (2008). Effects of diazinon and diazoxon on the lymphoproliferation rate of splenocytes from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): The immunosuppressive effect could involve an increase in acetylcholine levels. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 517–521.
- Guilhermino L., Lopes M.C., Carvalho A.P. & Soares, A.M.V.M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute test with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 32: 727-738.
- Gupta R. (2006). *Toxicology of organophosphate and carbamate compounds*. Elsevier Academic Press. p 768.
- Hatakeyama S. & Sugaya Y. (1989). A Freshwater Shrimp (*Paratya compressa improvisa*) as a Sensitive Test Organism to Pesticides. *Environmental Pollution* 59: 325-336.
- Hernández-López J., Gollas-Galván T. & Vargas-Albores. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the Brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C (1): 61-66.
- Holmblad T. & Söderhäll K. (1999). Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* 172: 111–123.
- Hurtado-Clavijo CM. & Gutiérrez de Salazar M. (2005). Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb* Vol. 53 No. 4: 244- 258.
- Hyne R. & Maher W. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 366–374.

- Jaime-Ceballos B., Galindo-López J., Laria-Lamela E., Cupul-Magaña F. & Vega-Villasante F. (2008). Traslado de postlarvas de *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) a diferentes tiempos, salinidades y densidades y su efecto en la supervivencia y algunos marcadores bioquímicos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(3): 681-686.
- Ji P.F., Yao C.L. & Wang Z.Y. (2009). Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. *Fish & Shellfish Immunology* 27: 563–570.
- Jiravanichpaisal P., Lee S.Y., Kim Y.A., Andrén T. & Söderhäll I. (2007). Antibacterial peptides in hemocytes and hematopoietic tissue from freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*: Characterization and expression pattern. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 441–455.
- Jiravanichpaisal P., Lee B.L. & Söderhäll K. (2006a). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211: 213–236.
- Jiravanichpaisal P, Sricharoen S, Söderhäll I. & Söderhäll K. (2006b). White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish & Shellfish Immunobiology* 20: 718–727.
- Johansson MW. & Soderhall K. (1989). Cellular Immunity in Crustaceans and the proPO System. *Parasitology Today*, vol. 5, no. 6.
- Jokanovic M., 2001. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* 166: 139–160.
- Key P.B., Fulton M., Harman-Fetcho J.A. & McConnell L.L. (2003). Acetylcholinesterase Activity in Grass Shrimp and Aqueous Pesticide Levels from South Florida Drainage Canals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45: 371–377.
- Key P., Fulton M., Layman S.L. & Scott G. (1998a). Azinphosmethyl Exposure to Grass Shrimp (*Palaemonetes pugio*) Life Stages with Emphasis on Larval Acetylcholinesterase Activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60:645-650.

- Key P., Fulton M., Scott G., Layman S. & Wirth E. (1998b). Lethal and sublethal effects of malathion on three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Aquatic Toxicology* 40: 311–322.
- Konstantinou I., Hela D. & Albanis T. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution* 141: 555- 570.
- Kousba A., Poet T. & Timchalk C. (2007). Age-Related Brain Cholinesterase Inhibition Kinetics following In Vitro Incubation with Chlorpyrifos-Oxon and Diazinon-Oxon. *Toxicological sciences* 95(1), 147–155.
- Kristoff G., Verrengia Guerrero N. & Cochón A. (2008). Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Chemosphere* 72: 1333–1339.
- Le Moullac G. & Haffner P. (2000). Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121–131
- Lee SY. & Soderhall K. (2002). Early events in crustacean innate immunity. *Fish & Shellfish Immunology* 12, 421–437.
- Li E., Chen L., Zeng C., Yu N., Xiong Z., Chen X. & Qin J.G. (2008). Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture* 274: 80–86.
- Li C.C., Yeh S.T. & Chen J.C. (2009). Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology* xxx: 1–7.
- Li W., Yin D., Zhang A. & Wang L. (2002). Toxicity of Chloroanilines and Effects on Superoxide Dismutase Activities in Serum of Crucian Carp (*Carassius auratus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68:630–636.
- Ling E. & Yu X.Q. (2005). Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1356–1366.

- Livingstone DR. (2001). Contaminant- stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution Bulletin* vol. 42. No. 8. Pp. 656- 666.
- Lorenzon S., Francese M., Smith V.J. & Ferrero E.A. (2001). Heavy metals affect the circulating haemocyte number in the shrimp *Palaemon elegans*. *Fish & Shellfish Immunology* 11: 459–472.
- Lykkesfeldt J. & Svendsen O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173: 502–511.
- Lyle-Fritch LP., Romero-Beltrán E. & Páez-Osuna F. (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). *Aquacultural Engineering* 35: 135–146
- Marcial H., Hagiwara A. & Snell T. (2005). Effect of some pesticides on reproduction of rotifer *Brachionus plicatilis* Müller. *Hydrobiologia* 546:569–5752.
- Martin M. & Gutierrez- Galindo E. (1989). Pesticides and PCBs in Oysters from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, Volume 20, No. 9. pp. 469-472.
- Mathew S, Ashok-Kumar K, Anandan R, Viswanathan-Nair PG & Devadasan K. (2007). Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145C: 315–320.
- McCord J. & Fridovich I. (1969). Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *The journal of biological chemistry*. Vol. 244, No. 22, Issue of November 25, pp. 6049-6065.
- McKinlay R., Plant JA., Bell J.N.B & Voulvoulis N. (2008). Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* 34: 168–183.
- Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova A., Tovar-Ramírez D., Hernández-Herrera R. & Racotta I. (2006). Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* 258: 633–640.



- Mexía- Salazar A.L., Hernández-López J., Burgos-Hernández A., Cortez-Rocha M.O., Castro-Longoria R. & Ezquerra-Brauer J. (2008). Role of fumonisin B1 on the immune system, histopathology, and muscle proteins of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry* 110: 471–479.
- Milla-Cotos O. & Palomino- Horna W. (2002). Tesis profesional: Niveles de colinesterasa sérica en agricultores de la localidad de Carapongo (Perú) y determinación de residuos de plaguicidas inhibidores de la acetilcolinesterasa en frutas y hortalizas cultivadas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Mineau P. (1991). Cholinesterase-inhibiting Insecticides: Their impact on Wildlife and the Environment. Ed. Elsevier Science Publishers. Canada. p.48.
- Mohankumar K. & Ramasamy P. (2006). White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Research* 115: 69–75.
- Morales, V. & Cuéllar-Anjel J. (2008). Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. Programa CYTED Red II-D Vannamei, Panamá, Rep. de Panamá. 270 pp.
- Muñoz M., Cedeño R., Rodríguez J., Van der Knaap W., Mialhe E. & Bachére E. (2000). Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191: 89–107.
- Osterauer R. & Kohler HR. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 86. 485–494.
- Osuna I., López D., Galindo J.G. & Riva M.C. (1997). Evaluación toxicológica de metil paratión, metil azinfos, clorpirifos, diazinon y metamidofos en camarones del genero *Penaeus* Sp. *Boletín Intexter (U.P.C.)*no. 111: 65-71.
- Ozcan Oruc E. & Usta D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23: 48–55.
- Páez- Osuna F., Gracia A., Flores-Verdugo F., Lyle- Fritch LP., Alonso- Rodríguez R., Roque A. y Ruiz- Fernández AC. (2003). Shrimp aquaculture development and

- the environment in the Gulf of California ecoregion. *Marine Pollution Bulletin* 46: 806–815.
- Pan G. & Dutta H. (1998). The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth bass *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. *Environmental research, section A* 79: 133- 137.
- Pan Z.C., He J.G., Weng S.P., Yin Z.X., Fu X.Z. & Li S.D. (2008). Changes in mortality and immunological variables of *Litopenaeus vannamei* parents and their filial families infected with white spot syndrome under different experimental conditions. *Fish & Shellfish Immunology* 25: 459-471.
- Parveen M. & Kumar S. (2005). Recent trends in the acetylcholinesterase system. IOS Press. p. 229.
- Peakall, D. (1992). *Animal Biomarkers as Pollution Indicators*. Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras 292pp.
- Perazzolo L., Gargioni R., Ogliari P. & Barracco M. (2002). Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214: 19–33.
- Pipe R. (1992). Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Developmental and Comparative Immunology*, Vol. 16: 111-122.
- Repetto M. (1995). *Toxicología avanzada*. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. p 621.
- Richardson B., Mak E., De Luca-Abbott S., Martin M., McClellan K. & Lam P. (2008). Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses?. *Marine Pollution Bulletin* 57: 503–514.
- Rickwood C. & Galloway T. (2004). Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. *Aquatic Toxicology* 67: 45–56.
- Rodríguez J. & Le Moullac G. (2000). State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* 191: 109–119.

- Ruppert EE. & Barnes RD. (1994). Invertebrate zoology. Saunders college publishing, USA, p 1056.
- Sarathi M., Ishaq- Ahmed V.P., Venkatesan C., Balasubramanian G., Prabavathy J. & Sahul-Hameed A.S. (2007). Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture* 271: 8–20.
- Svoboda M., Luskova V., Drastichova J. & Ilabek V. (2001). The effect of Diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Vet. Brno.*, 70: 457–465.
- Söderhäll I., Bangyeekhun E., Mayo S. & Söderhäll K. (2003). Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 661–672.
- Song Y.L., Yu C.I., Lien T.W., Huang C.C. & Lin M.N. (2003). Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome Virus. *Fish & Shellfish Immunology* 14: 317–331.
- Sritunyalucksana K., Gangnonngiw W., Archakunakorn S., Fegan D. & Flegel T. (2005). Bacterial clearance rate and a new differential hemocyte staining method to assess immunostimulant activity in shrimp. *Diseases of aquatic organisms*. Vol. 63: 89–94.
- Sritunyalucksana K. & Soderhall K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* 191: 53–69.
- Uner N., Ozcan-Oruc E., Sevgiler Y., Sahin N., Durmaz H. & Usta D. (2006). Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21:241–245.
- Van De Braak C. B. T., Botterblom M. H. A., Liu W., Tavernen N., Van Der Knaap W. P. W. & Rombout J. H. W. M. (2002). The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & Shellfish Immunology* 12: 253–272.

- Van Leeuwen C.J. & J.L.M. Hermes. (1995). Risk assessment of chemicals. An introduction. Kluwer Academic Publishers. p 374.
- Vargas- Albores F. & Barracco M. (2001). Capítulo 7: Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectínidos. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura A.N. Maeda-Martínez (ed.), Cap. 7: 127-146.
- Vázquez L., Sierra C., Juárez S., Agundis C., Zavala A. & Zenteno E. (1998). Mecanismos de inmunidad en crustáceos. Interciencia NOV - DEC, VOL. 23 N° 6
- Vijayavel K. & Balasubramanian M.P. (2009). Effect of fenvalerate on oxidative stress biomarkers in the brackish water prawn *Penaeus monodon*. Pesticide Biochemistry and Physiology 95: 113–116.
- Ware GW. & Whitacre DM. (2004). The Pesticide Book, 6th Ed. 496 pp. Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio.
- Winston G. & Di Giulio T. R. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. Aquatic Toxicology, 19: 137- 161.
- Xuereb B., Lefèvre E., Garric J. & Geffard O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquatic Toxicology 94: 114–122.
- Yeh S.P., Chen Y.N., Hsieh S.L., Cheng W. & Liu C.H. (2009). Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. Fish & Shellfish Immunology 26: 582–588.
- Yeh S.P., Sung T.G., Chang C.C., Cheng W. & Kuo C.M. (2005). Effects of an organophosphorus insecticide, trichlorfon, on hematological parameters of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquaculture 243: 383– 392.

## ANEXO I

### Solución isotónica de camarón con EDTA 2X (SIC- EDTA 2X)

#### ❖ Reactivos

---

Cloruro de sodio (NaCl)
Cloruro de Potasio (KCl)
Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico (HEPES)
Etilendiamin tetracético disódio (EDTA. Na <sub>2</sub> )
Agua destilada

---

- A) *Cloruro de sodio (NaCl) 900mM:*  
Pesar 26.298g de NaCl (PM: 58.44)
- B) *Cloruro de Potasio (KCl) 20Mm:*  
Pesar 0.7455g de KCl (PM: 74.55)
- C) *Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico (HEPES) 20Mm:*  
Pesar 2.383 de HEPES (PM: 238.3)
- D) *Etilendiamin tetracético disódio (EDTA. Na<sub>2</sub>) 20Mm:*  
Pesar 3.722g de EDTA Na<sub>2</sub> (PM: 372.2)

#### ❖ Procedimiento

Se incorporan todos los reactivos en 400ml de agua destilada; posteriormente se ajusta el pH a 7.3. Al ajustar el pH si los valores son mayores a 7.3 adicionar unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl), si por lo contrario esta debajo de 7.3 adicionar gotas de Hidróxido de Sodio (NaOH).

Después de ajustar el pH la solución se afora en 500ml. Una vez aforada la solución, se filtra utilizando un filtro de x  $\mu\text{m}$  y una bomba de vacío. La solución filtrada se vacía al frasco previamente esterilizado, se etiqueta y se mantiene a 4°C.

**\*Nota:** todo el material debe ir esterilizado antes de preparar el reactivo; además se recomienda hacer alícuotas de la solución para que no se contamine.

## ANEXO II

### Buffers

#### Buffer fosfato salino (PBS) pH 7.4:

❖ Reactivos:

Cloruro de sodio (NaCl)
Cloruro de Potasio (KCl)
Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Fosfato potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Agua destilada (H <sub>2</sub> O)

- A) *Cloruro de sodio (NaCl) 1.37M:*  
Pesar 80g de NaCl (PM: 58.44)
- B) *Cloruro de Potasio (KCl) 27mM:*  
Pesar 2g de KCl (PM: 74.55)
- C) *Fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 100mM:*  
Pesar 14.4g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PM: 141.96)
- D) *Fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 20mM:*  
Pesar 2.4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PM: 136.1)

❖ Procedimiento

Se disuelven todos los reactivos, y una vez preparada la solución se ajusta el pH a 7.4. Al ajustar el pH si los valores son mayores a 7.4 adicionar unas gotas de ácido clorhídrico concentrado (HCl), si por lo contrario esta debajo de 7.4 adicionar gotas de Hidróxido de Sodio (NaOH).

Finalmente, se esteriliza en autoclave durante 20 minutos. Almacenar a 4°C. La solución es estable por varios meses.

## Buffer de homogenización TRIS HCl pH 7.2

### ❖ Reactivos

TRIS HCl (ó TRIZMA HCl; $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ )
Agua destilada ( $H_2O$ )

- A) TRIS HCl (ó TRIZMA HCl;  $C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$ ) 0.1M:  
Pesar 15.76g de TRIS HCl (PM: 157.6)

### ❖ Preparación

Disolver 15.76g de TRIS HCl 0.1M en 1000ml de agua destilada ajustando el pH a 7.2. Una vez preparada la solución, almacenar a 4°C. La solución es estable por varias semanas.

## Buffer fosfatos 50mM, pH 7.4

### ❖ Reactivos

Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ )
Fosfato potasio ( $KH_2PO_4$ )
Agua destilada ( $H_2O$ )

- A) Fosfato disódico ( $Na_2HPO_4$ ) 0.05M:  
Pesar 7.584g de  $Na_2HPO_4$  (PM: 141.96) y disolver en 100ml de agua destilada.
- B) Fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ) 0.0132M:  
Pesar 1.8g de  $KH_2PO_4$  (PM: 74.55) y disolver en 100ml de agua destilada.

### ❖ Preparación

Disolver 7.584g de  $Na_2HPO_4$  en 100ml de agua; a su vez, disolver los 1.8g de  $KH_2PO_4$  en 100ml de agua. Mezclar ambas soluciones y aforar a 1000ml. Una vez preparada la solución, ajustar el pH a 7.4. Posteriormente, almacenar a 4°C, la solución es estable por varios meses.

## Buffer Cacodilato (Cac), pH 7.0

❖ Reactivos

---

Cacodilato de sodio ( $C_2H_6AsO_2Na$ ) 10mM  
Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) 10mM  
Agua destilada ( $H_2O$ )

---

A) *Cacodilato de sodio ( $C_2H_6AsO_2Na$ ) 10mM:* :  
Pesar 1.6g de  $C_2H_6AsO_2Na$  (PM: 160)

B) *Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) 10mM:*  
Pesar 1.1099g de  $CaCl_2$  (PM: 110.99)

❖ Preparación

Disolver el cacodilato de sodio y el cloruro de calcio en 1000ml de agua destilada. Una vez preparada la solución, ajustar el pH a 7.0. Posteriormente, almacenar a 4°C, la solución es estable por varios meses.



### ANEXO III

#### Solución madre y dosis de Diazinón

El Diazinón utilizado para preparar la solución madre, es grado técnico con 95.9% de pureza, entonces por cada 100g de producto habrá 95.9g de Diazinón ingrediente activo.

Para la preparación de la solución madre se tomó en cuenta el peso del organismo (12.25g), la dosis objetivo (40µg Diazinón/ g camarón), el volumen de solución madre deseado (25ml) y la cantidad de inóculo estimado por cada organismo (50µl).

Por ejemplo, si se desea inocular a un organismo de 12.25g, con una dosis de 40µg Diazinón/ g camarón, primeramente tenemos que conocer qué cantidad de Diazinón hay por camarón, por lo tanto:

Peso del organismo	Dosis	Diazinón total por camarón
(12.25g)	(40µg Diazinón/ g camarón)	490µg DZN

Cada organismo inoculado con 50µl de solución tendrá 490µg D. Si se desea preparar una solución madre de 25ml (25000µl), entonces se necesita saber qué cantidad de Diazinón se debe pesar para obtener 490µg D en 50µl de inóculo, por lo tanto:

<b>Diazinón total</b>	<b>µl</b>
490µg DZN	50µl
x	25000µl
<b>X= 245000µg DZN</b>	

Entonces de lo anterior se obtiene que, necesito pesar 245mg para preparar 25ml de solución madre al 100%, pero el reactivo Diazinón viene al 95.9% entonces:

<b>Diazinón a pesar</b>	<b>%</b>
490mg DZN	100
x	95.9
<b>X= 255.47mg DZN</b>	

Para la preparación de las dosis de 5, 15 y 25µg Diazinón/ g camarón, se partió de la solución madre de 40µg de Diazinón/ g camarón. Al igual que la solución madre lo primero que se tiene que hacer es conocer qué cantidad de Diazinón hay por camarón, por lo tanto:

Peso del organismo	Dosis	Diazinón total por camarón
(12.25g)	(5µg Diazinón/ g camarón)	61.25µg DZN
(12.25g)	(15µg Diazinón/ g camarón)	183.75µg DZN
(12.25g)	(25µg Diazinón/ g camarón)	306.25µg DZN

### Dosis de 25µg Diazinón/ g camarón

Cada organismo inoculado con 50µl de dosis 25ug/ g tendrá 306.25µg DZN. Si se desean preparar 5ml (5000ul) de esta dosis, entonces se necesita saber qué cantidad de ml hay que tomar de la solución madre, por lo tanto:

DOSIS 25 µg Diazinón/ g camarón	
Diazinón total	µl
306.25µg DZN	50µl
x	5000µl
X= 30625µg DZN en 5ml	
6.125mg DZN en 1ml	

Solución madre (40µg Diazinón/ g camarón)	
Diazinón total	ml
255.47mg DZN	25ml
10.2188mg DZN	1ml

C1	V1	C2	V2
10.2188mg/ml	x	6.125mg/ml	5ml
X= 2.996ml hay que tomar de la sol. madre			

### Dosis de 15µg Diazinón/ g camarón

Cada organismo inoculado con 50µl de dosis 15µg/ g tendrá 183.75µg DZN. Si se desean preparar 5ml (5000ul) de esta dosis, entonces se necesita saber qué cantidad de ml hay que tomar de la solución madre, por lo tanto:

<b>DOSIS 15 µg Diazinón/ g camarón</b>	
Diazinón total	µl
183.75µg DZN	50µl
x	5000µl
X= 18375µg DZN en 5ml	
3.675mg DZN en 1ml	

<b>Solución madre (40µg Diazinón/ g camarón)</b>	
Diazinón total	ml
255.47mg DZN	25ml
10.2188mg DZN	1ml

<b>C1</b>	<b>V1</b>	<b>C2</b>	<b>V2</b>
10.2188mg/ml	x	3.675mg/ml	5ml
X=1.798ml hay que tomar de la sol. madre			

### Dosis de 5µg Diazinón/ g camarón

Cada organismo inoculado con 50µl de dosis 5µg/ g tendrá 61.25µg DZN. Si se desean preparar 5ml (5000ul) de esta dosis, entonces se necesita saber qué cantidad de ml hay que tomar de la solución madre, por lo tanto:

<b>DOSIS 5 µg Diazinón/ g camarón</b>	
Diazinón total	µl
61.25µg DZN	50µl
x	5000µl
X= 6125µg DZN en 5ml	
1.225mg DZN en 1ml	

<b>Solución madre (40µg Diazinón/ g camarón)</b>	
Diazinón total	ml
255.47mg DZN	25ml
10.2188mg DZN	1ml

<b>C1</b>	<b>V1</b>	<b>C2</b>	<b>V2</b>
10.2188mg/ml	x	1.225mg/ml	5ml
X= 0.599ml hay que tomar de la sol. madre			

Las soluciones se prepararon un día antes del bioensayo, se guardaron en frascos ámbar y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de su uso. Procurar dar vortex antes de administrarla a los organismos para disolver bien el Diazinón.

## ANEXO IV

### Técnica: recuento total y diferencial de hemocitos

❖ Reactivos:

---

<b>Solución fijadora (Formalina 4% + NaCl 0.45M)</b>
<b>Agua destilada (H<sub>2</sub>O)</b>

---

A) *Formalina 4%* :

Tomar 54ml de formalina al 37%

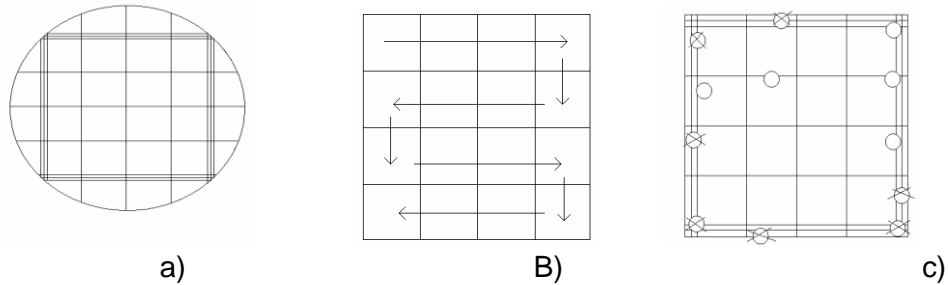
B) *Cloruro de Sodio (NaCl) 0.45M:*

Pesar 13.149g de NaCl (PM: 58.44) en 500ml de agua destilada

Una vez preparada la solución B, mezclar con la solución A, mantenerla a temperatura ambiente.

❖ Procedimiento:

Para realizar el recuento total de hemocitos, el microscopio electrónico se enfocó primeramente en el ocular 10x y, posteriormente se pasó al ocular de 40X, donde se visualizó individualmente un cuadrante (Fig. 1 a); y con ayuda del carro del microscopio se desplazó por la cuadrícula hasta contar las células presentes en todo el cuadro. Los recuentos se realizaron siguiendo las flechas para evitar que las células se cuenten dos veces o que no se cuenten (Fig. 1 b). Además se observaron 3 líneas que delimitan el cuadro, éstas definieron cuales células eran contables (las que no tocan la 2da línea) o cuales se encontraban fuera del campo de recuento (las que tocan o están encima de la 2da línea) (Fig 1 c).



**Fig. 1.- Vista de un cuadrante de la cámara de Neubauer con el ocular de 40x. a) cuadrante utilizado para realizar el recuento total; b) indicación de cómo se debe de realizar el recuento; c) indicación de las células que se deben de tomar en cuenta para el recuento.**

Posteriormente se contaron las células presentes en los otros 4 cuadrantes, siguiendo las mismas consideraciones descritas anteriormente, para después sumar el total de células obtenidas de los 5 cuadrantes y mediante la siguiente fórmula calcular el total de células por ml de hemolinfa (Sritunyalucksana *et al.*, 2005):

$$RTH = 5 * \sum \text{células} * 10^4 * \text{factor dilución (Ec. 1)}$$

Donde:

**5**= el número de cuadrantes contados (5)

**$\sum$  células**= total de células contadas en los 5 cuadrantes contados (x)

**$10^4$**  = se utiliza cuando se cuentan los cuadrados de los extremos.

**Factor de dilución**= dilución utilizada de la muestra, la solución fijadora y el anticoagulante. En este caso fue 3.

Para el recuento diferencial de hemocitos, en 20 $\mu$ l de hemolinfa fijada se cuentan 100 células (por ambos lados de la cámara) directamente en la cámara de Neubauer enfocando el microscopio en el ocular de 40x.

Posteriormente se toman las 200 células contadas como el 100% y se saca una relación en porcentaje, de los diferentes tipos de hemocitos (granulares, semigranulares y hialinos).

## ANEXO V

### Técnica Fenoloxidasa, fenoloxidasa total y profenoloxidasa

#### ❖ Reactivos:

---

**Solución L- dihidroxifenilalanina (L- DOPA)**  
**Solución Tripsina**  
**Buffer cacodilato (Cac) pH 7.0**

---

A) *Solución L- dihidroxifenilalanina (L- DOPA) 15mM :*

Pesar 3mg de L- DOPA y disolver en 1ml de buffer cacodilato pH 7.0

B) *Solución Tripsina:*

Pesar 1mg de Tripsina y disolver en 1 ml de Buffer cacodilato

C) *Buffer cacodilato pH 7.0:*

Ver anexo II

NOTA: La solución L- DOPA debe ser preparada antes de usarse porque es sensible a la luz; la solución tripsina es estable por varias semanas, pero debe mantenerse en frío (4°C).

#### ❖ Procedimiento:

La actividad fenoloxidasa fue determinada espectrofotométricamente a 490nm a través de la formación de un pigmento de color, el DOPAcromo, como producto de oxidación de la enzima sustrato L-hidroxifenilalanina (L- DOPA).

#### **FO:**

Colocar 10µl de muestra en microplaca.

Agregar 250µl de solución L-DOPA, e incubar durante 20min a 25°C.

Leer la intensidad óptica a 490nm.

#### **FO Total:**

Colocar 10µl de muestra en microplaca.

Adicionar 10µl de solución tripsina.

Adicionar 250µl de L-DOPA mantener a temperatura ambiente (25-28°C) durante 10min.

Medir la absorbancia a 490nm en un lector de placas.

❖ Cálculos

Una vez obtenidas las absorbancias, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la actividad específica (unidades FO/min/ mg prot), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Act. específica} = \frac{((\text{abs}) * (\text{FD}) / \text{TI (min)})}{\text{FO y FO total (min/ mg prot)} \quad \text{P (mg/ml)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

**Abs=** absorbancia de la muestra.

**FD=** factor de dilución, tomando en cuenta el anticoagulante y la hemolinfá obtenida, en este caso 2.

**TI=** tiempo de incubación, que fue de 10min ó 20 min.

**P=** concentración de proteínas de la muestra obtenidas mediante el método de Bradford.

La actividad de proFO, fue obtenida mediante la fórmula siguiente:

$$\text{proFO} = \text{FO Total} - \text{FO} \quad (\text{Ec. 3})$$

\*Los valores de actividad obtenidos para las actividades de FO y FO total se ajustaron a unidades, esto con la finalidad de que los valores fueran más manejables en términos de comparación. Una unidad de actividad de enzima es definida como un incremento en absorbancia de 0.001/min/ mg prot, por tal motivo el valor obtenido en la ecuación 2, se dividió entre 0.001.



## ANEXO VI

### Técnica Acetilcolinesterasa

#### ❖ Reactivos

---

**Solución 5, 5- ditiobis (2- acido nitrobenzoico) DTNB 270 $\mu$ M**  
**Solución Acetilcolina 3mM**  
**Buffer fosfatos 50mM**

---

- A) *Solución 5, 5- ditiobis (2- acido nitrobenzoico) DTNB 270 $\mu$ M:*  
Pesar 0.0107g de DTNB y disolver en 100ml de buffer fosfatos 50mM
- B) *Solución acetilcolina 3mM:*  
Pesar 0.0215g de Yoduro de acetilcolina y disolver en 25ml de agua destilada.

**Nota:** la solución DTNB es estable por varias semanas a 4°C; la solución acetilcolina debe prepararse momentos antes de usarse y mantenerse en la oscuridad.

#### ❖ Procedimiento

La AChE hidroliza el yoduro de acetiltiocolina (AChI) en tiocolina y acetato. La tiocolina reacciona con el ácido ditiodinitrobenzoico (DTNB) para formar el anión de ácido tionitrobenzoico (color amarillo), que se mide espectrofotométricamente a 414 nm. La tasa a la cual se forma el producto, representa la actividad de AChE (Ellman *et al.*, 1961), la cual se expresa como (nmol/min/mg de proteína).

Colocar 50 $\mu$ l de la muestra en cada celda de la microplaca.

Agregar 150 $\mu$ l de DTNB 270  $\mu$ M y dejar reposar 5 min.

Agregar con una pipeta multicanal 50 $\mu$ l de acetiltiocolina 3mM a cada celda de la microplaca.

Leer la absorbancia a 414nm.

Las lecturas se realizaron cada 20 segundos en un lapso de 10 minutos.

❖ Cálculos

Una vez obtenidas las absorbancias se realizaron los cálculos necesarios para evaluar la actividad de acetilcolinesterasa, la cual está dada por la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Acetilcolinesterasa} = \frac{\text{ABS} * \text{FDM} * \text{VT} (\mu\text{l})}{(\epsilon * d) * t (\text{min}) * \text{PROT} (\text{mg/ml}) * \text{FDP}} \quad (\text{Ec. 4})$$

[nmol/min-1/mg prot-1]

Donde:

**ABS**= absorbancia/min.

**PROT** = Concentración de proteína de la muestra (mg\*ml<sup>-1</sup>) medidas por el método de Bradford, 1976.

**FDP** = Factor de dilución utilizada en la proteína (en el caso de dilución).

**FDM** = Factor de dilución utilizada en el ensayo enzimático.

**VT** = Volumen total de la microcelda / Volumen de la muestra (225/25 = 9).

**t**= tiempo en minutos.

**ε** = 1.36x10<sup>4</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Coeficiente de extinción molar del ácido tionitrobenzoico).

**d**= diámetro de la microcelda (0.9 cm)

## ANEXO VII

### Técnica Superóxido dismutasa

#### ❖ Reactivos

---

Solución de trabajo tetrazolio soluble en agua (TSA)  
Solución de trabajo enzima xantina oxidasa (XO)  
Buffer dilución SOD  
Buffer solución SOD

---

A) *Solución de trabajo tetrazolio soluble en agua (TSA):*

Tomar 1ml de reactivo TSA y mezclar con 19ml de buffer solución

B) *Solución de trabajo enzima xantina oxidasa (XO):*

Tomar 15ul de enzima XO y mezclar con 2.5ml de buffer de dilución.

**Nota:** Cada uno de los reactivos a utilizar pertenecen al kit 19160 WST SOD Assay. La solución de trabajo TSA es estable por 2 meses a 4°C; la solución de trabajo enzima XO es estable por 3 semanas a 4°C. Ambos buffers ya vienen listos para usar.

#### ❖ Procedimiento

La actividad de la SOD, fue medida por su capacidad para inhibir reacciones dependientes de radical superóxido utilizando el Kit 19160 WST SOD Assay. Este kit utiliza una sal tetrazolio altamente soluble en agua TSA (2-(4-Iodofenil)- 3-(4- nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)- 2H-tetrazolio, sal monosodio), que produce un formazan soluble en agua, el cual es teñido después de la reducción con anión superóxido. El intervalo de reducción con anión superóxido es linealmente relacionado con la actividad de la xantina oxidasa, que es inhibida por la SOD. Por lo tanto, la inhibición de la SOD puede ser determinada por un método colorimétrico, que se mide espectrofotométricamente a 450nm (SIGMA- ALDRICH).

Para dicha técnica, se utilizaron 3 blancos, donde el blanco 2 es específico para cada una de las muestras. Las placas con blancos y muestras se llenaron de acuerdo a la siguiente tabla:

	BLANCO1	BLANCO2	BLANCO3	MUESTRAS
<b>muestra</b>	-	20ul	-	20ul
<b>agua</b>	20ul	-	20ul	-
<b>Solución trabajo WST</b>	200ul	200ul	200ul	200ul
<b>Solución enzima de trabajo</b>	20ul	-	-	20ul
<b>Buffer dilución</b>		20ul	20ul	-
<b>Volumen final (µl)</b>	240	240	240	240

\*Nota: cada muestra lleva su propio blanco2; la solución enzima de trabajo se adicionará al final, momentos antes de leer la absorbancia.

Posteriormente, se leyó la absorbancia a 450nm cada 2 min durante un lapso de 40min a 37°C.

#### ❖ Cálculos

Para realizar los cálculos, se graficaron las  $\Delta A_{450nm}$  contra tiempo de reacción de cada muestra, así como también cada uno de los blancos (blanco 1, 2 y 3) y se indicó la línea de tendencia de cada uno.

Una vez obtenida la pendiente (que es la  $\Delta A_{450nm}/min$ ) se calculó el % de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{((S1 - S3) - (SS - S2)) \times 100}{(S1 - S3)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

S1= pendiente blanco1

S2= pendiente blanco2, cada muestra tiene su blanco2 correspondiente

S3= pendiente blanco3

SS= pendiente de la muestra

## ANEXO VIII

### Técnica Peroxidación de Lípidos

#### ❖ Reactivos

---

**Solución cromogénica MFI**  
**Solución TMP**  
**HCl 37%**  
**Buffer fosfatos 50mM**

---

#### A) *Solución cromogénica MFI:*

Pesar 0.064g de 1-metil- 2-fenilindole, disolverlo en 30ml de acetonitrilo.  
Añadir 10ml de metanol

#### B) *Solución TMP:*

Tomar 0.0165ml de 1,1, 3, 3- tetrametoxipropano y mezclar con 10ml de Buffer fosfatos 50mM.

Una vez preparada la solución TMP, se hace una dilución 1:100 (20µl TMP más 1980µl de H<sub>2</sub>O), el cual será usado como estándar para las concentraciones de la curva.

#### C) *HCl 37%:*

#### D) *Buffer fosfatos 50mM:*

Ver anexo II

#### ❖ Procedimiento:

La medida del Malondialdehido (MDA) es extensamente usada como un indicador de peroxidación lipídica. El ensayo de MDA se basa en la reacción de un reactivo cromogénico (1-metil- 2-fenilindole) con MDA a 45 °C obteniéndose un compuesto cromóforo cuya absorbancia es leída a 595nm (Esterbauer *et al.*, 1991).

En tubos eppendorf previamente etiquetados se preparan las diferentes concentraciones de la curva, tal como se muestra en la siguiente tabla:

	0µM	1µM	2.5µM	5µM	10µM
<b>MFI- AN- MET</b>	325	325	325	325	325
<b>TMP diluído</b>	0	5	12.5	25	50
<b>H2O</b>	100	95	87.5	75	50
<b>HCl</b>	75	75	75	75	75
<b>Volumen final (µl)</b>	500	500	500	500	500

\*Nota: el HCl se adiciona al final, antes de incubar los tubos y se mezcla con vortex.

Para las muestras se colocaron 325µl de Solución cromogénica MFI, 75µl de HCl y 100µl de sobrenadante.

Una vez preparada la reacción, los tubos se incubaron en termoblock a 45°C durante 40 minutos. Después de incubarlas aparece un color rosa, debido a la producción de cromóforos.

Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13000rpm a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, se toman 200µl de muestra o estándar y se colocan en cada celda de la microplaca, para leer la absorbancia a una longitud de onda de 595nm.

#### ❖ Cálculos

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se graficaron los valores de absorbancia de la curva contra concentración (µM) para obtener la pendiente mediante una regresión lineal.

Para calcular los niveles de MDA se utilizó la siguiente fórmula, tomando en cuenta: la pendiente de la recta, así como el promedio de absorbancia de cada una de las muestras:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Abs} * (\text{Vol. total} / \text{vol muestra})}{\text{Pendiente} * \text{muestra (g/ml)}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

**Abs** = es el promedio de las absorbancias.

**Pendiente** = pendiente obtenida de la recta de la curva de calibración (abs/ $\mu$ mol)

**Volúmen total** = Volumen total contenido en el tubo Eppendorf ( $\mu$ l)

**Vol Muestra**= Volumen de muestra agregada al tubo ( $\mu$ l)

**Muestra (g/ml)**= peso húmedo de la muestra (g) entre el volumen total del tampón de homogeneización (ml).

Los resultados finales se expresan como nmol/ ml de hemolinfa

## ANEXO IX

### Técnica Proteínas

❖ Reactivos:

---

**Solución Bradford**  
**Solución albumina suero bovino (BSA)**  
**(1mg/ml)**

---

A) *Solución Albumina suero bovino (BSA) 1mg/ml:*

Pesar 10mg de BSA, disolverlo en 10ml de agua destilada.

Distribuirlo en alícuotas de 1ml y mantenerlos en congelación.

Para realizar la curva estándar se hace una dilución 1:1 de la solución anterior (100µl de BSA en 100µl H<sub>2</sub>O).

B) *Solución Bradford:*

Preparar el reactivo utilizando una relación 1:4 (BIORAD: agua) tomando en cuenta la cantidad de muestras a analizar y las concentraciones de la curva, así como también el número de réplicas.

Por ejemplo: (15muestras + 6 curva) x 4 repeticiones = 84 celdas x 250µl de Solución Bradford = 21000µl Solución Bradford. En base a esto será la cantidad de BIORAD y H<sub>2</sub>O que se va a utilizar para la preparación.

Relación 1:4

5ml BIORAD

20ml H<sub>2</sub>O

**25ml Solución Bradford**

**\*Nota:** ambos reactivos se preparan el día que se realiza la lectura, porque deben ser frescos. El reactivo de Bradford debe mantenerse en la oscuridad.

❖ Procedimiento:



Primeramente se comienza a llenar la placa con las diferentes concentraciones de la curva patrón, tal como se muestra en la siguiente tabla:

	0mg/ml	0.1mg/ ml	0.2mg/ ml	0.3mg/ ml	0.4mg/ ml	0.5mg/ ml
<b>BSA diluido</b>	0	2	4	6	8	10
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10	8	6	4	2	0
<b>Solución Bradford</b>	250	250	250	250	250	250
<b>Volumen final (µl)</b>	260	260	260	260	260	260

Posteriormente, se comienzan a verter en la placa 10µl de muestra. Tanto las muestras como la curva se hicieron por triplicado.

Una vez llena la placa, se agregan los 250µl de solución Bradford a todas las celdas, y se deja reposar 15 minutos para que se lleve a cabo la reacción. Posteriormente, se lee la absorbancia a 595nm en un lector de placas ELISA.

#### ❖ Cálculos

Los valores de absorbancia de la curva de calibración son utilizados para realizar una grafica de dispersión: concentración (µm) vs absorbancia (nm) para obtener la ecuación de la recta mediante una regresión lineal. El valor de la pendiente es la que se utiliza para obtener los cálculos.

En el caso de las muestras, la concentración de la proteína se obtiene de la siguiente ecuación:

$$y = mx + b \text{ (Ec. 7)}$$

$$x = [y - b] / m \text{ (Despejando Ec. 7, da la Ec. 8)}$$

Donde:

x = es la concentración de proteína

y = es la absorbancia de la muestra

b = es la ordenada al origen

m = es la pendiente de la recta

Una vez que se obtiene la concentración de la proteína, se calcula el promedio de las 3 réplicas de cada muestra y este valor promedio se utiliza para los cálculos de las actividades de Fenoloxidasa, SOD, y acetilcolinesterasa.